

**Chemische, physiologische
und bakteriologische Untersuchungen
zur Stickstoffixierung
im Harkortsee (Ruhr)**

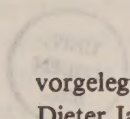
**INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**vorgelegt von
Dieter Jaeger
aus Odenspiel (Krs. Oberberg)**

Marburg/Lahn 1977

**Chemische, physiologische
und bakteriologische Untersuchungen
zur Stickstoffixierung
im Harkortsee (Ruhr)**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**


**vorgelegt von
Dieter Jaeger
aus Odenspiel (Krs. Oberberg)**

Marburg/Lahn 1977

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 30. November 1977

Tag der mündlichen Prüfung am 15. Dezember 1977

Berichterstatter: Prof. Dr. D. WERNER

Mitberichterstatter: Prof. Dr. L. HARTMANN
(Karlsruhe)



Vorwort

Die vorliegende Arbeit hätte ohne die Mithilfe zahlreicher Persönlichkeiten nicht verwirklicht werden können, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. D. WERNER, für die Überlassung dieses Themas, für die fachliche Betreuung und die vielfältigen Anregungen und Hinweise. Zu großem Dank verpflichtet bin ich dem inzwischen pensionierten Leiter des Staatlichen Amtes für Wasser- und Abfallwirtschaft Hagen, Herrn Reg.-Bau-dir. a.D. K. NARTEN, der mir die Durchführung der Untersuchungen ermöglichte und stets ein großes Interesse am Fortgang der Arbeit zeigte.

Dank sagen möchte ich an dieser Stelle auch meinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor des Staatl. Amtes f. Wasser- und Abfallwirtschaft Hagen, insbesondere der Chemielaborantin Frau R. BOBINSKI, die unter meiner Anleitung die chemischen Schlamm- und Wasseranalysen durchführte, sowie der Chemotechnikerin Frau J. PLATO für das Reinzeichnen der Abbildungen.

Dem Ruhrverband in Essen, Besitzer und Betreiber des Harkortsees, danke ich für die Überlassung eines großen Motorbootes mit Besatzung zu Probenentnahmen und für die Genehmigung zur Durchführung der Untersuchungen. Danken möchte ich auch meiner Frau, indem ich ihr diese Arbeit widme. Sie übernahm den größten Teil der anfallenden Schreibarbeiten.

Hagen, im Juni 1977

Dieter Jaeger



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552327_0021

Gliederung und Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Problemstellung der Arbeit	8
1.2. Die Stickstoffumsetzungen eines Gewässers	9
1.3. Die Nitrogenase	13
1.3.1. Physikalische Eigenschaften der Nitrogenase	13
1.3.2. Die Sauerstoffempfindlichkeit der Nitrogenase	14
1.3.3. Das Verhalten der Nitrogenase gegen Stickstoffverbindungen	16
1.3.4. Die Temperaturempfindlichkeit der Nitrogenase	17
1.3.5. Reaktionen und Substrate der Nitrogenase	18
2. Material und Methode	19
2.1. Der Azetylenreduktionstest	19
2.1.1. Das Verhältnis von Azetylenreduktion und Stickstofffixierung ($C_2H_4/2 NH_3$)	19
2.1.2. Gaschromatograph und Schreiber ...	22
2.1.3. Allgemeine Arbeitsbedingungen für den C_2H_2 - C_2H_4 -Test am Gaschromatographen	22
2.1.4. Erstellung einer Eichgeraden für Äthylen	24
2.1.5. Auswertung der Chromatogramme und absolute Eichung des GC	25
2.1.6. Bestimmung des stoffspezifischen Korrekturfaktors für Äthylen	27
2.2. Entnahme der Schlammproben und allgemeine Probenvorbereitung	29
2.2.1. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von der Inkubationstemperatur	30
2.2.2. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Ammoniumgehalt ..	31
2.2.3. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Nitratgehalt	31
2.2.4. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck	31

2.2.5.	Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von Antibiotika-Zugaben	32
2.3.	Chemische und physikalische Methoden zur Wasser- und Schlammuntersuchung	33
2.3.1.	Temperatur	33
2.3.2.	pH-Wert	33
2.3.3.	Wassergehalt, Trockengewicht, Glührückstand und Glühverlust ..	33
2.3.4.	Ammonium und organisch gebundener Stickstoff	34
2.3.5.	Nitrit	36
2.3.6.	Nitrat	37
2.3.7.	Gesamtstickstoff	37
2.3.8.	Sulfat	38
2.3.9.	Phosphat	39
2.3.10.	Oxidierbarkeit	39
2.3.11.	Elektrische Leitfähigkeit	40
2.3.12.	Gesamt-Eisen	40
2.3.13.	Kupfer	41
2.3.14.	Mangan	41
2.3.15.	Gesamt-Chrom	41
2.4.	Die bakteriologische Untersuchung des Schlammes	42
2.4.1.	Die Bestimmung der Koloniezahl (früher "Gesamtkeimzahl")	43
2.4.2.	Die Bestimmung von ESCHERICHIA COLI und coliformen Bakterien ..	44
2.4.3.	Die Bestimmung der fakultativen und obligaten Anaerobier	45
2.5.	Die biologische Untersuchung des Wasserkörpers	46
2.6.	Das Untersuchungsgebiet	48
3.	Charakteristik des Harkortsees	51
3.1.	Biologische, bakteriologische und chemische Befunde des Wasserkörpers und Schlammes an verschiedenen Stellen (A-E) des Harkortsees	51
3.2.	Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom natürlichen Ammoniumgehalt des Schlammes an verschiedenen Stellen des Harkortsees	55

3.3. Chemisch-physikalische Eigenschaften des Schlammes an der Entnahmestelle F in den Jahren 1974 und 1975	58
3.4. Der Zusammenhang von Ammoniumgehalt und organisch gebundenem Stickstoff im Schlamm des Harkortsees	62
3.5. Die biologische Besiedlung des Harkortsees an der Entnahmestelle F von Juli 1974 bis Oktober 1975	63
4. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von der Inkubationstemperatur	73
4.1. Die experimentelle Bestätigung der "Q ₁₀ -Regel"	76
4.2. Die Bestimmung der chemischen Azetylenreduktionsraten sterilisierter und veraschter Schlammproben	77
4.3. Der Verlauf der Azetylenreduktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ...	80
5. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von höheren Ammoniumgehalten	82
6. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Nitratgehalt	85
7. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck und Jahresgang der aeroben und anaeroben Stickstofffixierung.	88
8. Die Abhängigkeit der aeroben Azetylenreduktionsrate von Antibiotika-Zugaben	93
9. Berechnungen zur bakteriellen Stickstofffixierung und zur Denitrifikation im Harkortsee	96
9.1. Jährlich anaerob fixierte Stickstoffmenge	96
9.2. Jährlich aerob fixierte Stickstoffmenge.	97
9.3. Jährlich durch Blaualgen fixierte Stickstoffmenge	98
9.4. Berechnung der jährlichen Denitrifikation im Harkortsee	99
10. Die Bestimmung der Koloniezahl, Coli-Keimzahl und der fakultativen und obligaten Anaerobier im Schlamm des Harkortsees	100
11. Die Beeinflussung der Azetylenreduktionsrate durch verschiedene Elutionsmittel	101

12. Untersuchungen zur optimalen Zusammensetzung der Nährlösung zum Anzüchten von Primärkulturen stickstofffixierender Bakterien	105
12.1. Das Nährmedium	105
12.2. Untersuchung von <i>ESCHERICHIA COLI</i> und coliformen Keimen auf Stickstofffixierer	107
12.3. Untersuchung der "Gesamt-Anaerobier" auf Stickstofffixierer	108
12.4. Untersuchung der Koloniezahl auf Stickstofffixierer	109
12.5. Versuch der Reinkultur von stickstofffixierenden Enterobacteriaceen (<i>KLEBSIELLA</i>) in Flüssigkultur	110
13. Die Reinkultur fakultativ anaerober diazotropher Bakterien als Plattenkulturen	111
13.1. Das neue Nährmedium	111
13.2. Die Erstellung der Reinkulturen der Stickstofffixierer	114
13.3. Diagnostizierung der Stickstofffixierer	116
14. Zusammenfassung und Diskussion	120
14.1. Zusammenfassung	120
14.2. Diskussion	124
15. Anhang	136
15.1. Verzeichnis der Abbildungen	136
15.2. Verzeichnis der Tabellen	137
16. Literaturverzeichnis	139
17. Lebenslauf	149

Verzeichnis der im Text verwandten Abkürzungen

a	: Jahr
AS	: Aminosäure
ATV	: Abwassertechnische Vereinigung
BP	: Blindproben
BSB	: Biologischer Sauerstoffbedarf
DEV	: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm- untersuchungen (Fachgruppe Wasserchemie, 1975)
Diff.	: Differenz
FID	: Flammenionisationsdetektor
GC	: Gaschromatograph
Gew.-Güte	: Gewässergüte
os	: oligosaprob
ßms	: ß-mesosaprob
ams	: a-mesosaprob
ps	: polysaprob
h	: Stunde
ha	: Hektar
Ink.-Temp.	: Inkubationstemperatur
Ink.-Zeit	: Inkubationszeit
MW	: Mittelwert
nMol	: nano-Mol
org. geb. N	: organisch gebundener Stickstoff
pO ₂	: Sauerstoffpartialdruck
pC ₂ H ₂	: Azetylenpartialdruck
Red.-Rate	: Azetylenreduktionsrate
S	: Standardabweichung
Sapr.-Stufe	: Saprobitätsstufe
sKf	: stoffspezifischer Korrekturfaktor
TCA	: Trichloressigsäure
t _{dr}	: Gesamtretentionszeit
TRIS	: Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS	: Trockensubstanz

1. Einleitung

Das größte Stickstoffreservoir auf der Erde ist neben dem in der Erdrinde vorhandenen Anteil die Atmosphäre. Ihr Hauptbestandteil ist mit rund 78 Vol% der Stickstoff, gefolgt von Sauerstoff mit 20 - 21 Vol%. Der Stickstoff ist ein typisches Inertgas, das bei Zimmertemperatur nur mit Lithium reagiert und an Reaktionsfähigkeit nur von den Edelgasen übertroffen wird. Diese Reaktionsträgheit erklärt sich aus der Elektronenkonfiguration. Die drei 2p-Niveaus der L-Schale sind bei einem Atom jeweils mit einem Elektron besetzt. Zur Erreichung einer Elektronenkonfiguration, die edelgasähnlichen Charakter hat, gehen die p-Niveaus zweier Atome eine Elektronenpaarbindung ein, so daß eine $N \equiv N$ Dreifachbindung zustande kommt. Die Folge ist ein völlig symmetrisches Molekül ohne Polarisierung, weil beide Atome die gleiche Elektronegativität aufweisen. Hieraus erklärt sich auch die hohe Bindungsenergie von 225 Kcal/Mol.

Autotrophe wie heterotrophe Organismen sind auf die Zufuhr von Stickstoff angewiesen. Den chemo- und photoautotrophen Organismen genügt im allgemeinen anorganisch gebundener Stickstoff in Form von Ammonium- oder Nitratsalzen. Weitergehende Ansprüche haben die heterotrophen Organismen. Sie sind üblicherweise sowohl C- wie N-heterotroph, d.h. auf die Zufuhr von organischen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen angewiesen. Das Problem der Stickstoffversorgung liegt in der Nutzbarmachung des atmosphärischen Stickstoffs. Eine untergeordnete Rolle spielen die Bildung von Stickstoffoxiden durch elektrische Entladungen bei Gewittern, wie auch zahlreiche andere abio-logische Oxidations- und Hydratationsvorgänge. Eine herausragende Stellung nimmt jedoch die als "biologische Stickstofffixierung" bezeichnete Reduktion des molekularen Luftstickstoffs zu Ammoniak ein. Mikroorganismen, die diese Fähigkeit besitzen, finden sich in der Systematik ver-

streut, ohne daß engere verwandtschaftliche Beziehungen zwischen ihnen erkennbar wären, außer daß sie alle Prokaryonten sind. Die Diazotrophie ist bei den freilebenden Bakterien in 3 von 10 Ordnungen und in 11 von 47 Familien, bei den Blaualgen in 2 von 3 Ordnungen und 6 von 8 Familien bisher nachgewiesen worden (BURNS & HARDY, 1975).

Bei den symbiontisch mit höheren Pflanzen zusammenlebenden stickstofffixierenden Mikroorganismen kommt der Bakteriengattung RHIZOBIUM besondere Bedeutung zu, die an Leguminosenwurzeln die bekannten Knöllchen bilden, aber auch einigen Actinomyceten, die in den Wurzeln von Erle, Sanddorn und Ölweide dieselbe Funktion ausüben.

Welch immense Bedeutung der biologischen Stickstofffixierung zukommt, geht aus einem Zahlenvergleich hervor. So wird von verschiedenen Autoren die jährliche biologische Stickstofffixierung insgesamt mit mindestens $180 \cdot 10^6$ t veranschlagt (WERNER, 1974; QUISPÉL, 1974). Die fixierten Stickstoffmengen schwanken dabei je nach Ökosystem und Symbionten zwischen 90 - 300 kg N_2 pro ha und Jahr. Für wässerige Ökosysteme und Schlämme mit freilebenden Stickstofffixierern liegen nach HARDY & HOLSTEN, (1972) die fixierten Stickstoffmengen zwischen 0,60 - 5,0 kg N_2 pro ha und Jahr für die untersuchten Wasserkörper und zwischen 1,83 mg bis zu 104 mg N_2 pro kg Schlamm und Jahr. Der biologischen Stickstofffixierung stand eine jährliche chemische Produktion an Düngemitteln von rund $40 \cdot 10^6$ t gebundenem N im Jahre 1973 gegenüber (Statistisches Bundesamt, 1976).

In zahlreichen Veröffentlichungen wurden die Stickstofffixierungsraten in den Wasserkörpern von Seen untersucht (FOGG, 1971; GRANHALL & LUNDGREEN, 1971; HORNE & FOGG, 1970; HOWARD et al., 1970; KEIRN & BREZONIK, 1971; RUSNESS & BURRIS, 1970; STEWART et al., 1971). Hier sind die Stickstofffixierer vorwiegend Blaualgen, während den diazotrophen Bakterien nur eine sehr untergeordnete Rolle zukommt. Wenige Arbeiten befassen sich mit der Stickstofffixierung in Schlammsedimenten (BREZONIK & HARPER, 1969;

BROOKS et al., 1971; KAWAI & SUGAHARA, 1971; SUGAHARA et al., 1971), hier vorwiegend jedoch in marinen Biotopen.

Neben der vorwiegend englischsprachigen Literatur zu dem komplexen Themenkreis der biologischen Stickstofffixierung sollten auch einige deutsche Darstellungen nicht übersehen werden (CZYGAN, 1971; FISCHLER & KOERNER v. GUSTORF, 1975; HÜBEL & HÜBEL, 1974 a und b; KLEINER, 1975; RÜDIGER, 1972; WERNER, 1974).

Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die natürliche Bakterienpopulation eines limnischen Sedimentes untersucht. Die Schlammablagerungen im Harkortsee bieten günstige Lebensbedingungen für fakultativ und obligat anaerobe Bakterien. Da in einer solchen Lebensgemeinschaft Stickstofffixierer zu erwarten sind, wurde mittels Azetylenreduktionstest die biologische Stickstofffixierungsrate bestimmt.

1.1. Problemstellung der Arbeit

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, systematische Untersuchungen zu verschiedenen Abhängigkeiten der bakteriellen Stickstofffixierung an einem natürlichen Ökosystem, hier dem Schlamm des Harkortsees, durchzuführen. Wie an anderer Stelle noch gezeigt wird, ist das reine Enzym Nitrogenase gegen verschiedene Einflüsse in vitro mehr oder weniger empfindlich. Ähnliche Beobachtungen wurden auch an Reinkulturen aerober wie anaerober Stickstofffixierer gemacht. Diese Beeinflussungen wurden aufgegriffen und in der vorliegenden Arbeit erstmalig systematisch an einem natürlichen Schlammsediment untersucht, das eine stark positive Stickstofffixierung zeigte. Der Zusammenhang von Azetylenreduktion und Stickstofffixierung wird im folgenden noch eingehender behandelt. So wurde zunächst die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von der Inkubationstemperatur untersucht, um die optimale Bebrütungstemperatur für die folgenden Versuchsserien zu

bestimmen. Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Ammonium- und Nitratgehalt greifen die Beeinflussung der Nitrogenase durch Stickstoffverbindungen auf.

Die Versuche zur Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck sollten einerseits die Reaktion der N_2 -Fixierung in einem natürlichen Ökosystem gegen die schädigenden Einflüsse von Sauerstoff untersuchen, andererseits auch feststellen, welche Art von Stickstofffixierern, aerobe, fakultative oder obligate Anaerobier, die Azetylenreduktion hier ausführen. Neben diesen Abhängigkeiten wurden zahlreiche biologische, bakteriologische, chemische und physikalische Untersuchungen des Wasserkörpers und des Schlammes durchgeführt um festzustellen, welche Beziehungen und Abhängigkeiten hier zwischen verschiedenen Parametern untereinander auftreten, aber auch ob und welche Verbindungen zur Stickstofffixierung bestehen. Zum Schluß wurde das zahlenmäßige Verhältnis der Stickstofffixierer von der Koloniezahl (aerob), Coli-Keimzahl (fakultativ anaerob) und Gesamt-Anaerobier (obligat anaerob) bestimmt. Die stickstofffixierenden Bakterien wurden in Reinkultur gezüchtet und determiniert.

Die von Blaualgen im Wasserkörper des Harkortsees durchgeführte Stickstofffixierung wurde nicht untersucht. Die Arbeit sollte ein möglichst umfassendes Bild über ökologische Daten in einem überschaubaren Biotop liefern, die irgendeinen Einfluß auf die Stickstofffixierung eines natürlichen Schlamm-sedimentes haben.

1.2. Die Stickstoffumsetzungen eines Gewässers

Der weitaus größte Teil der Stickstoffumsetzungen findet im Boden bzw. im Wasser und seinen Schlamm-sedimenten statt. Es soll an dieser Stelle nur auf die wichtigsten Stickstoffkreisläufe und Umsetzungen, die im Harkortsee ablaufen könnten, hingewiesen werden, wobei auch die beteiligten Bakterien genannt werden sollen. Die bakteriellen Aufbau- und Synthesereaktionen werden nicht näher

behandelt.

Eine Übersicht über die Stickstoffkreisläufe gibt Abb. 1.

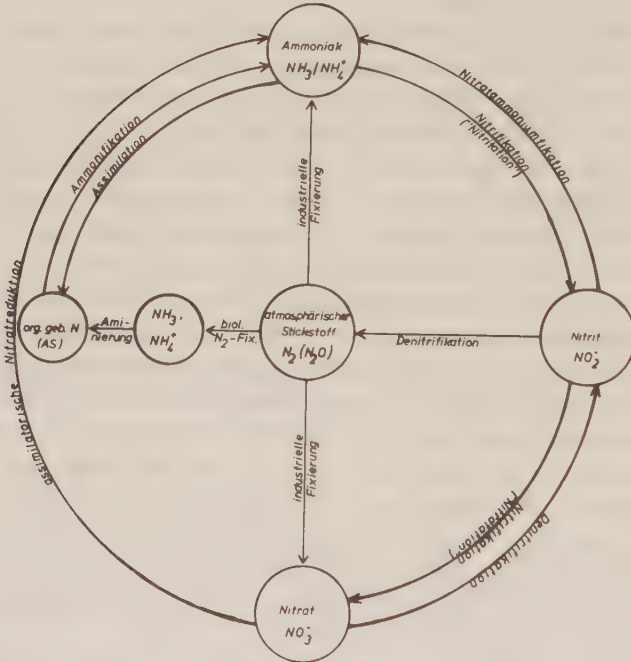


Abb. 1: Die Stickstoffkreisläufe eines Gewässers.
(verändert nach PÖPPINGHAUS, 1975).

Die Ruhr nimmt zahlreiche Kläranlageneinleitungen auf, in den Harkortsee selbst mündet der Ablauf der Kläranlage Hagen ein. Da die kommunalen Abwässer stets stark organisch belastet sind, kommen die verschiedensten organischen Stickstoffverbindungen hier vor. Sie liegen hauptsächlich als Aminosäuren in pflanzlichen und tierischen Proteinen vor. Über den Weg der sogenannten "Ammonifikation" werden durch Stoffwechselaktivitäten von Fäulnisbakterien und Pilzen große Mengen NH_3 über Desaminierung von Aminosäuren freigesetzt. Zusätzlich

gelangt Ammonium über die biologische Stickstoff-fixierung in die Gewässer. Damit wird der für den pflanzlichen Stoffwechsel nicht verwertbare molekulare Stickstoff in eine Form überführt, der den biologischen Kreislauf durchlaufen kann. Zu den freilebenden Stickstofffixierern gehören zahlreiche Blaualgen wie z.B. ANABAENA, NOSTOC, CALOTHRIX, TRICHODESMIUM, Bakterien der Gattungen AZOTOBACTER, BEIJERINCKIA, DERXIA, AZOTOCOCCUS und AZOMONAS (aerob), CLOSTRIDIUM, BACILLUS und METHANOBACILLUS (obligat anaerob), die Purpurbakterien RHODOSPIRILLUM und CHLOROBIIUM, die fakultativ anaeroben Bakterien KLEBSIELLA und ENTEROBACTER, sowie möglicherweise einige Vertreter der Actinomyceten (NOCARDIA, ACTINOMYCES), doch bestehen hier noch Widersprüche hinsichtlich der Stickstofffixierung.

Eine direkt verwertbare N-Quelle für kohlenstoffheterotrophe und photoautotrophe Pflanzen kann das Ammonium sein. Der Ammoniak, bzw. das Ammonium-Ion, nimmt im gesamten Stickstoffkreislauf eine zentrale Stellung ein. Bei Anwesenheit von Sauerstoff dient NH_3 als Energielieferant für Nitritbakterien (z.B. NITROSOMONAS), die Ammoniak zu Nitrit oxidieren ("Nitritation"). Dieses wiederum wird von anderen Bakterien (z.B. NITROBACTER) zu Nitrat oxidiert ("Nitratation"). Die Nitratbildung ist wesentlich an den O_2 -Gehalt des umgebenden Milieus gebunden. TOBIAS, (1974) weist für den Main alljährlich von Juni bis November das höchste Sauerstoffdefizit nach. Parallel damit geht das Sommer-Herbst-Minimum an NO_3 -Stickstoff einher. Daraus ist zu folgern, daß insbesondere Nitratbakterien besonders empfindlich gegen unteroptimale Sauerstoffversorgung sind. Demnach ist im Winter und Frühjahr mit einem NO_3 -Maximum zu rechnen. Dieses ist neben TOBIAS auch von anderen Autoren für andere Vorfluter nachgewiesen worden (FRIEDERICH, 1973). Die bisher geschilderten oxidativen Vorgänge werden summarisch als "Nitrifikation" bezeichnet. Das Nitrat-Ion ist der wichtigste N-Lieferant für Pflanzen.

Es kann bei Algenblüten in eutrophierten Gewässern rasch aufgezehrt werden und wird dann zum begrenzenden Wachstumsfaktor. Auf einem Seitenweg ist ausgehend vom Nitrat durch "Denitrifikation", wobei N_2 und N_2O gebildet werden, mit gasförmigen Verlusten zu rechnen. Die "Denitrifikation" wird auch als "Nitratatmung" bezeichnet. Das Nitrat erfüllt die Funktion des Sauerstoffs und fungiert im anaeroben Milieu als H-Acceptor. Für die "Denitrifikation" sind fakultativ anaerobe Bakterien verantwortlich. Hierher gehören - je nach Nährstoffangebot - Bakterien der Gattungen PSEUDOMONAS, BACILLUS, MICROCOCCUS und THIOBACILLUS. Die bakterielle "Denitrifikation" ist mit Sicherheit für örtlich und zeitweise eintretende N-Verluste verantwortlich zu machen. Sie spielt eine große Rolle bei anaeroben Standorten mit stagnierender Nässe.

Ebenfalls im anaeroben Milieu verlaufen die oben geschilderten Nitrifikationsvorgänge unter Beteiligung von fakultativen bzw. obligaten Anaerobiern invers, d.h. ausgehend vom NO_3^- über NO_2^- zum NH_3 . Dieser Weg wird als "Nitratammonifikation" bezeichnet. Zu den fakultativ anaeroben Bakterien, die hierzu befähigt sind, gehören Vertreter der Gattungen PSEUDOMONAS, THIOBACILLUS, MICROCOCCUS, CORYNEBACTERIUM. Neben diesen sind auch zahlreiche aerobe Bakterien in der Lage, unter anaeroben Lebensbedingungen Nitrat als terminalen H-Acceptor zu benutzen, z.B. bestimmte Stämme von AEROBACTER und ESCHERICHIA COLI. Diese kurz geschilderten Prozesse sollten die je nach Umweltbedingungen möglichen Stickstoffumsetzungen in einem Gewässer aufzeigen und die zentrale Bedeutung des Ammonium-Ions im gesamten Stickstoffkreislauf unterstreichen. Darüberhinaus sollte auch gezeigt werden, daß dem Nitrat-Ion bei der "Denitrifikation" im Zusammenhang mit einer Reduzierung der Gewässereutrophierung eine größere Bedeutung beigemessen werden muß.

1.3. Die Nitrogenase

Allen stickstofffixierenden Organismen gemeinsam ist der Besitz des Enzyms Nitrogenase. Dieses Enzym, das neben einigen Hilffsystemen verantwortlich ist für die Bindung, Aktivierung und Reduktion des Stickstoffmoleküls zum Ammoniak, soll im folgenden charakterisiert werden, da für die Untersuchungen eines stickstofffixierenden Ökosystems Erkenntnisse der Biochemie wichtig sind. Die Reaktionen der diazotrophen Organismen auf physikalische und chemische Reize, gemessen als Abhängigkeit der Stickstofffixierungsrate von diesen Einflüssen, werden verständlicher, wenn die Reaktionen des reinen Enzymkomplexes, der die Stickstofffixierung durchführt, bekannt sind.

1.3.1. Physikalische Eigenschaften der Nitrogenase

Lösliche Nitrogenasen wurden vorwiegend aus Clostridien- und Azotobacter-Kulturen gewonnen, einige Enzymextrakte auch aus Leguminosenknöllchen und verschiedenen Blaualgen-Arten. Alle Nitrogenasen ähneln sich in ihrem Aufbau, sind jedoch nie völlig identisch. Es soll hier nicht näher auf die z.T. nur geringfügigen Unterschiede eingegangen werden. In ihrem Grundbauplan sind alle bisher untersuchten Nitrogenasen gleich. Sie sind ein Komplex eines Mo-Fe-Proteins = Fraktion I, sowie zweier Fe-Proteine = Fraktion II. Nur gemeinsam führen beide Komponenten die biologische Stickstofffixierung durch, wobei das optimale Mischungsverhältnis in vitro 1 Mol Fraktion I und 2 Mole Fraktion II zu sein scheint (HARDY et al., 1971 a und 1971 b; HARDY & BURNS, 1968; POSTGATE, 1970). Die Nitrogenase ist das einzige bekannte Enzym, das eine Dreifachbindung ($N \equiv N$, $HC \equiv CH$, $N \equiv CR$, $RN \equiv C$) zu spalten vermag. Das Molekulargewicht der Fraktion I liegt bei etwa 200 000, das der Fraktion II schwankt zwischen 62 000 und 68 000. Eine detaillierte Zusammenstellung der Unterschiede bei den einzelnen Nitrogenasen ist bei BURNS & HARDY, (1975 S. 83) zu finden.

1.3.2. Die Sauerstoffempfindlichkeit der Nitrogenase

Das gereinigte Enzym Nitrogenase wird bei kurzer Exposition in Luft irreversibel geschädigt bzw. inaktiviert und ist dann nicht mehr zur Stickstofffixierung befähigt. Seine Sauerstoffempfindlichkeit steigt mit dem Sauerstoffpartialdruck und der Temperatur an und ist zudem abhängig vom Reinheitsgrad der Enzymextrakte. Je reiner das Enzym ist, desto empfindlicher reagiert es auf Sauerstoffefflüsse. Dabei sind Nitrogenasen der aeroben Stickstofffixierer unempfindlicher gegen Sauerstoff als die der obligaten Anaerobier (ZUMFT & MORTENSON, 1975). Untersucht man Nitrogenase-Rohextrakte auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Sauerstoff, so ergibt sich eine fortschreitende Inaktivierung in der Reihenfolge:

AZOTOBACTER < KLEBSIELLA < BACILLUS < CLOSTRIDIUM, mit keinem Aktivitätsverlust bei AZOTOBACTER, bis zu 75% Verlust bei CLOSTRIDIUM bei Exposition in Luft für 10 min bei 20 °C (BURNS & HARDY, 1975).

An intakten Zellen aerober Stickstofffixierer wurde allgemein die Beobachtung gemacht, daß maximale Stickstofffixierungsraten bei Sauerstoffpartialdrücken zwischen 0,1 und 0,2 atm auftreten, wobei mit 0,2 atm bereits die Aktivitätsspitze überschritten ist (BROUZES et al., 1971; MILEKHINA et al., 1971; NICHOLAS, 1963).

Clostridien, als obligate Anaerobier, gedeihen nur im streng anaeroben Milieu und sind auch nur hier zur Stickstofffixierung befähigt. Die fakultativ anaeroben Bakterien, wie KLEBSIELLA, sowie die photosynthetisch aktiven Purpurbakterien RHODOSPIRILLUM und CHLOROBIVM benötigen ebenfalls anaerobe Bedingungen für die Stickstofffixierung. Die symbiontischen Knöllchenbakterien (RHIZOBIVM) wiederum wachsen nur unter streng aeroben Kulturbedingungen, wobei Sauerstoffpartialdrücke zwischen 0,2 - 0,5 atm optimal sind.

Es bleibt die Frage offen, wie die aeroben Stickstofffixierer in vivo ihre Nitrogenase vor Sauerstoffinaktivierung schützen. DROZD & POSTGATE, (1970) haben hierzu ein Modell vorgeschlagen, das sie als "Switching on"

und "Switching off" Prozesse bezeichnen. Diese werden in den folgenden 10 Punkten zusammenfassend erläutert.

- 1.) Aerobe Stickstofffixierer zeigen in den seltensten Fällen ihre optimale Nitrogenase-Aktivität bei atmosphärischen Sauerstoffpartialdrücken.
- 2.) Flüssigkulturen, die irgendwann während ihres Wachstums kurzzeitig reinem Sauerstoff ausgesetzt werden, verlieren die Fähigkeit zur Stickstofffixierung weitgehend oder völlig, auch wenn nach dieser Exposition bei optimalem pO_2 weiterinkubiert wird.
- 3.) Bei ruhenden, d.h. nicht wachsenden Bakterien, wird die Nitrogenase durch eine Konformationsänderung geschützt. Das Enzym nimmt eine Form an, in der die sauerstoffempfindlichen Stellen dem Sauerstoffangriff entzogen werden. Die Stickstofffixierung kann in diesem Zustand nicht durchgeführt werden.
- 4.) Bei wachsenden und stickstofffixierenden Bakterien nimmt die Nitrogenase eine Konformation an, in der sie zwar empfindlich gegen Sauerstoffeinflüsse ist, durch eine erhöhte Atmungsrate wird die Umgebung der Nitrogenase jedoch künstlich sauerstoffverarmt. Dieser Prozeß wird "respiratorischer Schutz" ("respiratory protection") genannt.
- 5.) Es besteht eine direkte Abhängigkeit zwischen dem optimalen Sauerstoffpartialdruck für das Bakterienwachstum und der Stickstofffixierung einerseits und der Atmungsrate der Population andererseits. Je höher die Atmungsrate, desto mehr Sauerstoff toleriert die Bakterienpopulation, bevor es zu einer Hemmung der Stickstofffixierung kommt.
- 6.) Die Atmungsrate ist weitgehend abhängig von der Populationsdichte und ganz besonders abhängig von den angebotenen Nährstoffen. Mit dem Absinken der Atmungsrate bei Phosphat-, Kohlenstoff- oder Energiedonatorenmangel, steigt die Empfindlichkeit gegen Sauerstoff (s. auch POSTGATE, 1971).
- 7.) *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* und *AZOTOBACTER VINELANDII* schalten ihre Nitrogenase-Aktivität teilweise oder

ganz ab ("switching off"), wenn die Kulturen heftig in atmosphärischer Luft geschüttelt werden. Dieser Vorgang wird sogleich umgekehrt, wenn die Kultur ruhig steht und der Sauerstoffpartialdruck in der Lösung wieder auf den für das Wachstum optimalen Wert absinkt ("switching on"). Die Stickstoff-fixierungsrate erreicht dann üblicherweise wieder ihren Ausgangswert, kann aber auch bis zu 30 % darunter liegen.

- 8.) Die "switching off" und "switching on" Prozesse verlaufen zu schnell, als daß man eine Zerstörung der Nitrogenase durch hohe Sauerstoffgehalte mit einer anschließenden Neusynthese vermuten könnte.
- 9.) Die aeroben Stickstofffixierer sind also zu einem aktiven "respiratorischen Schutz" ihrer Nitrogenase und zu einem passiven Schutz durch "Konformationsänderung" befähigt.
- 10.) Elektronenmikroskopische Untersuchungen von AZOTO-BACTER VINELANDII zeigten zahlreiche innere Membranen. Unlösliche und sauerstofftolerante Enzympräparate deuteten darauf hin, daß die Nitrogenase in diesem Zustand mit den inneren Membranen assoziiert ist (s. auch PATE et al., 1973). Durch osmotische Behandlung abgelöste Enzyme hingegen erwiesen sich als löslich und sauerstoffempfindlich. Möglicherweise repräsentieren diese beiden Zustände den "switched on" und "switched off" Zustand.

1.3.3. Das Verhalten der Nitrogenase gegen Stickstoffverbindungen-----

Im Wasserkörper bzw. Schlamm sediment eines Sees laufen zwei konkurrierende Prozesse ab. Auf der einen Seite ist in eutrophierten Seen, wie ihn der untersuchte Harkortsee darstellt, ein ständig ausreichendes Angebot an gebundenem Stickstoff vorhanden. Das Wachstum der Mikroorganismen kann ungebrems ablaufen. Der konkurrierende Prozeß dazu besteht in der Hemmung der Nitrogenase-Aktivität bei bestimmten Ammonium- oder Nitratgehalten. Diese

Hemmung wird darauf zurückgeführt, daß molekularer Stickstoff durch die Nitrogenase zum Ammoniak reduziert wird, und daß die Gegenwart freier Ammoniumverbindungen eben diese Nitrogenase-Aktivität verlangsamt oder hemmt (BURNS & HARDY, 1975; BURRIS, 1966; DILWORTH, 1966; HARDY et al., 1971; NICHOLAS, 1963; POSTGATE, 1970).

Der Grad der Hemmung ist bei gleichen Konzentrationen gebundenen Stickstoffs von Organismus zu Organismus unterschiedlich. Eine vollständige Hemmung der Stickstofffixierung fanden DUONG & TIEDJE, (1971) bei dem Purpurbakterium RHODOMICROBIUM bereits bei NO_3^- bzw. NH_4^+ -Gehalten von 0,005 %. Im Gegensatz dazu kam STEWART, (1969) zu dem Ergebnis, daß zellfreie Extrakte von AZOTOBACTER bis zu einem Ammoniumgehalt von 40 mg/l die Stickstofffixierung normal weiterführten. Konzentrationen bis zu 150 mg NH_4^+ /l spielten eine Rolle bei intakten Zellen von AZOTOBACTER, nicht durch Hemmung der Nitrogenase-Aktivität, sondern durch Hemmung der Nitrogenase-Neusynthese (s. auch FOGG, 1974). Stickstoffverbindungen sind generell als Inhibitoren für das Zusammenfügen der einzelnen Nitrogenase-Bausteine zu einem funktionsfähigen Enzymkomplex anzusehen. Wenn jedoch die Konzentrationen unter der inhibitorischen Grenze liegen, können sie sogar diese Synthese stimulieren. Es ist noch nicht klar, ob diese Förderung dann direkt auf die Nitrogenase-Biosynthese einwirkt, oder mehr auf allgemein wachstumsfördernde Einflüsse zurückgeht.

1.3.4. Die Temperaturempfindlichkeit der Nitrogenase

Bei intakten Zellen stickstofffixierender Organismen wird im allgemeinen eine untere Aktivitätsgrenze der Nitrogenase um 0 °C angenommen. Die Empfindlichkeit der einzelnen Stickstofffixierer gegen höhere Temperaturen ist jedoch unterschiedlich. Auch die Bausteine des Nitrogenase-Enzymkomplexes reagieren verschieden auf Temperatureinflüsse. So wurde von RÜDIGER, (1972) für das Fe-Protein der Nitrogenase nachgewiesen, daß es die temperaturempfindlichere Komponente ist. Sie wird unterhalb von etwa 12 °C

inaktiv. Das Mo-Fe-Protein hingegen zeigte keine negativen Auswirkungen bei niedrigen Temperaturen. Gleichzeitig wurde festgestellt, daß die Nitrogenasen der aeroben Organismen im allgemeinen kälteunempfindlicher sind als die der Anaerobier. Bei Nitrogenase-Extrakten nimmt auch die Empfindlichkeit gegen Temperatureinflüsse mit steigendem Reinheitsgrad zu. Im Gegensatz zu dieser Kälteempfindlichkeit ist erstaunlich, daß reine Nitrogenase-Extrakte von *AZOTOBACTER*, *CLOSTRIDIUM* und *BACILLUS* trotz 10 - 15 min Erhitzen auf 50 - 60 °C verhältnismäßig stabil blieben und ihre Aktivität nicht einstellten, während beispielsweise "Sojabohnen-Nitrogenase" (*RHIZOBIUM*) durch eine gleichartige Behandlung bereits zerstört war (BURNS & HARDY, 1975). Auch Blaualgen führten in Thermalquellen selbst bei 54 °C noch eine nennenswerte Stickstofffixierung durch (FOGG, 1974).

1.3.5. Reaktionen und Substrate der Nitrogenase

Eine zusammengefaßte Darstellung der Substrate zeigt (Abb. 2), daß neben Stickstoff auch zahlreiche andere Substrate mit Dreifachbindungen von der Nitrogenase reduziert werden können (HARDY & KNIGHT, 1967). Dabei kommt der Reduktion des Azetylens zum Äthylen analytisch die größte Bedeutung zu.

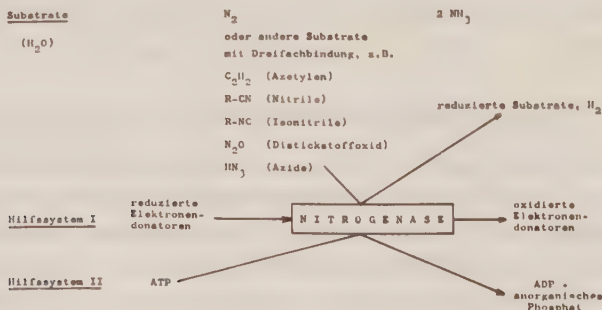


Abb. 2: Substrate und Reaktionsmechanismen der Nitrogenase (verändert nach RÜDIGER, 1972).

Mit Hilfe des Azetylenreduktionstestes, der im Abschnitt 2.1. näher behandelt wird, kann die Stickstofffixierungsrate schnell und mit großer Genauigkeit bestimmt werden. Zwei Hilfsysteme sind neben der Nitrogenase für die Reduktion des Stickstoffs notwendig. Das Reduktionsmittel ist in vivo ein Ferredoxin. Das energieliefernde Hilfsystem ist ATP.

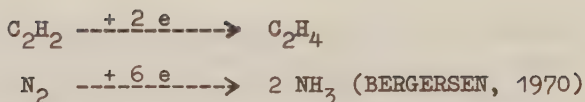
2. Material und Methode

2.1. Der Azetylenreduktionstest

Grundlegende Arbeiten zum Azetylen-Äthylen-Reduktionstest stammen von HARDY & BURNS, (1968); KOCH & EVANS, (1966); SILVER, (1967); STEWART et al., (1967). Eine ausführliche Zusammenfassung unter verschiedenen Gesichtspunkten findet sich bei HARDY et al., (1973). Mit der umfassenden Anwendung dieses Testes wurde ebenfalls festgestellt, daß es kein biologisches System gibt, das bei positiver Azetylenreduktion nicht auch Stickstoff fixieren kann (WERNER, 1974). Dieser indirekte Test hat den entscheidenden Vorteil, daß das gebildete Äthylen als gasförmiges Endprodukt freigesetzt wird und keiner weiteren Umsetzung im N-Metabolismus unterliegt.

2.1.1. Das Verhältnis von Azetylenreduktion und Stickstofffixierung ($C_2H_4 / 2 NH_3$)

Die Bestimmung des stöchiometrischen Verhältnisses zwischen der in vitro gemessenen Azetylenreduktion und der tatsächlichen Stickstofffixierungsrate in situ ist in den Fällen von großer Bedeutung, in denen aus dem Azetylenreduktionstest absolute Werte der Stickstofffixierung errechnet werden sollen. Ein theoretischer Umrechnungsfaktor von reduziertem Azetylen zu fixiertem Stickstoff beträgt 3,



so daß die Anzahl nMol fixierter Luftstickstoff aus den gebildeten nMol Äthylen durch Division mit 3 zu berechnen sind.

Eine mathematische Formel zur Bilanzierung der Stickstofffixierung aus der Azetylenreduktion geben HARDY et al., (1971). Danach errechnet sich die Menge des fixierten Stickstoffes:

$$\text{mg N}_{\text{fix.}} = \sum_0^t \frac{\text{mMol (C}_2\text{H}_2 \text{ ---} \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4) \times 28}{3}$$

dabei sind: t = Inkubationszeit (h),

28 = Molekulargewicht N₂.

Experimentelle Bestimmungen des Umrechnungsfaktors zeigen jedoch, daß er nicht immer genau 3 beträgt, sondern auch darunter oder darüber liegen kann. Diese Abweichung von der theoretischen Zahl 3 ist mit der kompetitiven Hemmung der Stickstofffixierung durch Azetylen zu erklären (BROUZES & KNOWLES, 1971; BURRIS, 1969; DILWORTH, 1966; KELLY, 1968; SCHÖLLHORN & BURRIS, 1967; SCHRAUZER & DOEMENY, 1971). Der im Azetylenreduktionstest üblicherweise gewählte pC₂H₂ von 0,1 atm hemmt die Stickstofffixierung fast völlig bei gleichzeitig fortschreitender Reduktion des Azetylens zum Äthylen. Das Äthylen hat auf die Stickstofffixierung keinerlei Einfluß. Die spezifische Aktivität der Nitrogenase für die Reduktion des mit dem N₂-Molekül isosterischen und isoelektrischen Azetylenmoleküls ist 2,5 mal größer als für das Stickstoffmolekül. Auch die etwa 65 fach höhere Löslichkeit des Azetylens in Bezug auf Stickstoff spielt im wässrigen Milieu eine große Rolle. Auch der durch die Hydrogenase-Tätigkeit der Nitrogenase gebildete Wasserstoff, die sogenannte "ATP-abhängige H₂-Entwicklung", hemmt die Stickstofffixierung, nicht jedoch die Azetylenreduktion.

Eine Zusammenstellung von experimentell ermittelten Umrechnungsfaktoren findet sich bei HARDY et al., (1973).

Die betragen beispielsweise:

für Nitrogenase in vitro:	3,6
für stickstofffixierende Bakterien (AZOTOBACTER und KLEBSIELLA):	4,3
für stickstofffixierende Blaualgen (ANABAENA und NOSTOC):	3,2
für Leguminosen (GLYCINE, PISUM, TRIFOLIUM):	3,9
für nicht-Leguminosen (ALNUS):	2,4
für stickstofffixierende Boden- und Schlammsysteme:	4,3

Sehr hohe Umrechnungsfaktoren zwischen 10 und 22 wurden von BROUZES et al., (1971), sowie von RICE & PAUL, (1971) ermittelt.

Die experimentelle Bestimmung des Umrechnungsfaktors für die vorliegende Arbeit war daher erforderlich. Durch Kjeldahl-Destillation wurde der Ammoniumgehalt der Schlammproben unmittelbar vor Versuchsbeginn und nach 96 h Inkubationszeit bestimmt. Für die zweite Destillation wurden anaerobe Proben ohne Chemikalienzusätze verwandt. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 25 °C im Dunkeln in einem Schüttelwasserbad. Es ergaben sich folgende NH_4^+ -Gehalte:

Datum der Probenentnahme	Ausgangsammoniumgehalt in mg/kg Schlamm	Endammoniumgehalt nach 96 h in mg/kg Schlamm
11.7.74	152	211
11.7.74	158	178
5.8.74	177	217
5.8.74	188	264
Mittelwert	169	218
Umrechnung auf		
nMol NH_4^+ /kg	9337	12044
Differenz	2707 nMol	

Die Anzahl der unter gleichen Versuchsbedingungen gebildeten nMol C_2H_4 betrug nach 96 h Inkubationszeit für die Schlammproben vom:

11.7.74	10102 nMol C_2H_4 /kg
5.8.74	12637 nMol C_2H_4 /kg

Mittelwert: 11370 nMol C_2H_4 /kg.

Die Berechnung des Umrechnungsfaktors

$$\begin{array}{l} (\text{nMol } C_2H_4 : \text{nMol } NH_4^+) \\ (11370 : 2707) \end{array}$$

ergab einen Wert von 4,2. Dieser Faktor deckt sich sehr gut mit dem bei HARDY et al., (1973) angegebenen Faktor von 4,3 für die diazotrophen Bakterien AZOTOBACTER und KLEBSIELLA, sowie für stickstofffixierende Boden- und Schlammssysteme.

2.1.2. Gaschromatograph und Schreiber

Gaschromatograph:	VARIAN Aerograph Modell 940
Säule:	SS 6 ft x 1/8 zoll (= 1,8 m x 0,3 cm)
Säulenfüllung:	PORAPAK T, 100/120 mesh
Trärgas:	Stickstoff reinst
Detektor:	Flammenionisationsdetektor
Schreiber:	VARIAN Modell A 25 Einkanal- schreiber
Eingangsspannung:	1 mV
Vollausschlag:	1 sec (low filter)

2.1.3. Allgemeine Arbeitsbedingungen für den C_2H_2 - C_2H_4 -Test am Gaschromatographen

Säulentemperatur:	50 °C
Injektortemperatur:	110 °C
Detektortemperatur:	115 °C
Elektrometerstellung:	1×10^{-10}
Papiervorschub:	1 cm/min

Gasströme: $N_2 : H_2 : \text{Luft}$
= 30 : 30 : 300 ml/min.
Bei diesen Gasströmen ergibt sich die höchste Empfindlichkeit des Detektors.

Septumwechsel am Einspritzblock: Grundsätzlich nach jeder neuen Probenserie, mindestens nach jeder 15. Injektion.

Spritzen: Gasdichte 1 ml Kunststoffspritzen. In den GC injiziert wurden 0,5 ml Gasgemisch aus den Proben. Die Spritze wurde nach jedem Gebrauch 5x mit reinstem Stickstoff gespült, um Kontaminationen anderer Proben zu vermeiden.

Retentionszeiten: t_{dr} Äthylen: 60 sec;
 t_{dr} Azetylen: 144 sec.
Zwischen beiden peaks berührt der Schreiber deutlich die Basislinie.

Dauer einer Untersuchung: etwa 4 min.

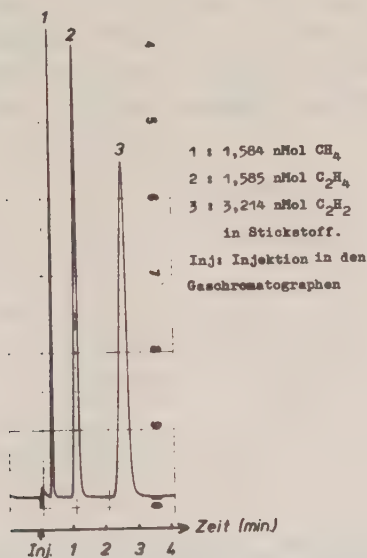


Abb. 3: Typisches Chromatogramm für die gaschromatographische Trennung von Methan, Äthylen und Azetylen (Geräteparameter im Text Abschnitt 2.1.3.).

2.1.4. Erstellung einer Eichgeraden für Äthylen

Zu Beginn der Untersuchungen wurde eine Eichkurve für Äthylen in dem zu erwartenden Konzentrationsbereich von 0,5 - 5 nMol C_2H_4 erstellt um sicherzugehen, daß der FID des GC linear arbeitet. Als Vergleichsgas diente das Laborgas-Äthylen der Fa. MESSER-GRIESHEIM mit einer garantierten Reinheit von $\geq 99,95$ Vol%. Diese Angabe wurde durch eigene gaschromatographische Untersuchungen bestätigt.

Zur Erstellung der Eichgeraden wurden 8 Winkler-Flaschen, die in der Wasseranalytik für "BSB"-Untersuchungen benutzt werden, mit destilliertem Wasser gefüllt, mit einem Serumstopfen verschlossen und das genaue Flaschenvolumen durch Auswägen ermittelt. Die im Brutschrank getrockneten Flaschen wurden 5 min mit N_2 ausgegast, dann 4 Flaschen mit je 1 ml Äthylen versetzt. Nach Schütteln und 5 min Stehen gibt man von dieser 1. Verdünnung je 1 ml auf die vier restlichen Winkler-Flaschen. Man erhält so eine 2. Verdünnung, von der 1 ml ca. $7,2 \times 10^{-5}$ ml Äthylen = 3,2 nMol enthält.

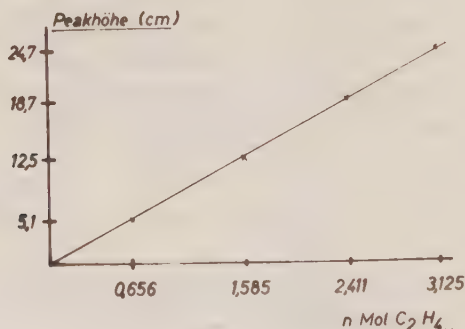


Abb. 4: Eichgerade für die quantitative gaschromatographische Bestimmung von Äthylen im Azetylen-Reduktionstest der biologischen Stickstofffixierung. Einstellung des GC siehe Abschnitt 2.1.3.

Durch Wahl der geeigneten Flaschengrößen und Injektion verschiedener Mengen in den GC kann man die entsprechenden Verdünnungen erzielen.

injiziertes Spritzen- volumen in ml	Gehalt an Äthylen in ml x 10 ⁻⁵	Mittelwerte der Peakhöhen in cm	nMol
0,20	1,47	0,656	5,1
0,50	3,55	1,585	12,5
0,75	5,40	2,411	18,7
1,00	7,20	3,125	24,7

Jede Messung wurde 4 mal wiederholt und der Mittelwert der Peakhöhen gebildet. Diese wurden graphisch aufgetragen und es zeigte sich, daß die Eichgerade linear verläuft (s. Abb. 4).

2.1.5. Auswertung der Chromatogramme und absolute Eichung des GC

Die Ermittlung der im Reduktionstest gebildeten Menge Äthylen über die "Peakhöhenmethode" erschien aus mehreren Gründen besonders geeignet:

- 1.) Die Basislinie im Chromatogramm ist eindeutig zu bestimmen.
- 2.) Die Peakhöhen sind schnell auszumessen.
- 3.) Es handelt sich um eine einfache quantitative Auswertungsmethode.
- 4.) Die Standardabweichung beträgt nur $\pm 1 \%$.
- 5.) Das zu untersuchende Gasgemisch hat stets die gleiche Zusammensetzung.
- 6.) Die Aufgabenstellung ist immer gleich (Routineanalytik).
- 7.) Der Äthylenpeak ist sehr schlank. Die Breite in halber Höhe ist nur ungenau zu bestimmen, so daß die Auswertung nach der "Peakflächenmethode" ausschied.

Die Nachteile der "Peakhöhenmethode" sollen nicht verschwiegen werden:

- 1.) Der lineare Bereich für solche Auswertungen ist verhältnismäßig klein.
- 2.) Die Peakbreite bleibt nur bis zur gerade beginnenden Überlastung des Trennsystems annähernd konstant, so daß die Stoffmenge nur bis zu diesem Punkt aus der Peakhöhe ermittelt werden kann, d.h. $h_A = \text{Konst.} \times \text{Menge A}$. Wenn die Kapazität des Trennsystems überschritten wird, sinkt die Trennleistung und die Breite des Peaks steigt an. Dann ist aber immer noch $h_A \times b_{1/2 A} = \text{Menge A}$ ("Peakflächenmethode"), wegen des nicht mehr konstanten $b_{1/2 A}$ gilt aber nicht mehr $h_A = \text{Konst.} \times \text{Menge A}$ ("Peakhöhenmethode").

Für die ausführliche Ableitung und mathematische Behandlung dieses Problems sei auf KAISER, (1969, 1. Teil) verwiesen. Diese Nachteile kamen jedoch im vorliegenden Fall nicht zum Tragen, da bei Aufstellung der Eichgeraden festgestellt wurde, daß mindestens bis zum Vollausschlag des Schreibers sich die Breite des Peaks in halber Höhe nicht ändert. Die im Azetylenreduktionstest ermittelten Peakhöhen überschritten bei konstanter Elektrometerstellung nur in Ausnahmefällen die Schreiberbreite, so daß die "Peakhöhenmethode" im vorliegenden Fall angewandt wurde.

Die Peakhöhe ist aber nicht nur von der injizierten Stoffmenge A, sondern auch von einigen Arbeitsvariablen und Geräteparametern abhängig, wie z.B.:

- 1.) Gasströme an Träger- und Brenngasen;
- 2.) Ofentemperatur;
- 3.) Injektortemperatur;
- 4.) Druckabfall auf der Säule;
- 5.) Dosiergeschwindigkeit, Art der Dosierung, etc.

Diese Größen unterlagen selbst bei genauester Kontrolle geringfügigen Schwankungen, wenn der GC an verschiedenen Versuchstagen neu eingestellt wurde, die aber ausreichten, die Peakhöhe geringfügig zu beeinflussen. Aus

diesem Grunde wurde vor jeder Probenserie eine Eichung des GC vorgenommen. Es wurde nach dem im Abschnitt 2.1.4. geschilderten Verfahren eine 2. Verdünnung von Laborgas-Äthylen hergestellt, von der 0,20 ml 0,656 nMol C_2H_4 enthielten. Diese Menge wurde 6x in den GC injiziert und der Mittelwert der Peakhöhen gebildet. Diese schwankten zwischen 5,5 - 6,0 cm. Der Mittelwert diente als Bezugsgröße für die Berechnung des Äthylengehaltes der Meßproben nach der Formel:

$$A : B = C : x \qquad x = \frac{B \cdot C}{A}$$

A: Mittelwert der Peakhöhen aus der Eichprobe (cm);
B: Gehalt der Eichprobe an Äthylen (hier: $1,47 \cdot 10^{-5}$ ml);
C: Höhe der Meßpeaks (cm);
x: Gesuchte Menge Äthylen in den Meßproben ($x \cdot 10^{-5}$ ml).

Durch diese Art der Auswertung hoben sich zufällige und variable Geräteparameter auf (KAISER & GOTTSCHALK, 1972). Die Menge des gebildeten Äthylens und auch die Azetylenreduktionsraten wurden auf 1 kg Schlamm umgerechnet und in nMol C_2H_4 /kg, bzw. die Reduktionsraten in nMol $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ angegeben.

2.1.6. Bestimmung des stoffspezifischen Korrekturfaktors für Äthylen

Bei der Besprechung der "Peakhöhenmethode" wurde erwähnt, daß die Auswertung eines digitalen Meßwertes (= Chromatogramm) zwar eine Stoffmenge A ergibt, die Peakhöhen oder -flächen aber nicht exakt den Mol- oder Gewichtsprozenten der gesuchten Substanzen entsprechen. Es sind Abweichungen von 5 - 10% möglich. Aus diesem Grunde wurde der stoffspezifische Korrekturfaktor für Äthylen ermittelt. Dieser "sKf" ist eine relative, dimensionslose Zahl, mit welcher der exakte Flächen- oder Höhenwert einer GC-getrennten Komponente multipliziert werden muß, damit das analytische Endergebnis in Gewichtsprozent erhalten wird. Für die genaue Ableitung des "sKf" und die Vorausberechenbarkeit von

Korrekturfaktoren sei auf KAISER, (1969, 2. Teil) verwiesen.

Es ist international festgelegt, daß zur Bestimmung des "sKf" als Bezugssubstanz Benzol und als Einheit 1,000 gilt. Benzolpeaks werden als "richtig" vorausgesetzt. Da bei den hier vorliegenden Analysen Benzol nicht vorkam, wäre es umständlich und unnötig gewesen, auf Benzol bezogene Korrekturfaktoren zu ermitteln. In diesen Fällen kann auch die den Prozeß bestimmende Hauptkomponente, im vorliegenden Falle Azetylen, als Bezugstoff gewählt und dessen Korrekturfaktor = 1,000 gesetzt werden.

Das aus Calciumcarbid nach einem bei POSTGATE, (1972) beschriebenen Verfahren hergestellte Azetylen hatte nach eigenen Untersuchungen eine GC-Reinheit von 99,75 Vol% (Berechnung nach der 100%-Methode). An Begleitsubstanzen waren 0,22 Vol% Methan und 0,03 Vol% Äthylen enthalten. Nach dem bereits geschilderten Verfahren wurde eine 2. Verdünnung von Azetylen und Äthylen hergestellt, bei den vorgenannten Betriebsbedingungen 2 x 0,5 ml in den GC injiziert und der Mittelwert der Peakflächen errechnet. Die Berechnung des stoffspezifischen Korrekturfaktors erfolgte nach der bei KAISER, (1974) angegebenen Formel:

$$sKf = \frac{E_i \cdot R_i \cdot A_B}{E_B \cdot R_B \cdot A_i}$$

Dabei sind:

- A_B = Peakfläche der Bezugssubstanz B hier: 0,99 cm²;
- A_i = Peakfläche der Testsubstanz i " : 1,05 cm²;
- E_B = die zur Messung des Korrekturfaktors verwendete Menge Bezugssubstanz B in Gramm im Eichgemisch (Azetylen) " : 0,977x10⁻⁵g;
- E_i = wie oben, jedoch g Testsubstanz " : 1,052x10⁻⁵g;
- R_B = Reinheit der Bezugssubstanz (C₂H₂) " : 99,75 Vol%;
- R_i = Reinheit der Testsubstanz (C₂H₄) " : 99,95 Vol%.

In die Formel eingesetzt errechnet sich der Korrekturfaktor:

$$sKf = \frac{1,052 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot 99,95 \text{ Vol\%} \cdot 0,99 \text{ cm}^2}{0,977 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot 99,75 \text{ Vol\%} \cdot 1,05 \text{ cm}^2}$$
$$sKf = 1,017$$

Da der systematische Fehler des stoffspezifischen Korrekturfaktors mit 1,7% geringer war als die Summe der unsystematischen Fehler wie Probendosierung, Geräteparameter, Auswertung, usw. wurde auf seine Anwendung verzichtet.

2.2. Entnahme der Schlammproben und allgemeine Probenvorbereitung

Die Schlammproben wurden mit einem Bodengreifer nach BIRGE-EKMANN am linken, östlichen Ufer des Harkortsees 650 m unterhalb der Einleitungsstelle der Kläranlage Hagen von einem Bootsteg aus entnommen. Dieser Steg liegt im mittleren Drittel des Sees. Die Proben wurden in ein verschließbares Gefäß umgefüllt, im Labor der über dem Schlamm verbliebene Luftraum 5 min mit Stickstoff ausgegast, anschließend zum Homogenisieren des Schlammes kräftig geschüttelt. Etwa 5 g wurden in 50 ml fassende Steilbrustfläschchen gegeben, sofort mit einem Serumstopfen verschlossen, gewogen und das Schlammgewicht ermittelt. Sämtliche Geräte und Gegenstände, die mit dem Schlamm in Berührung kamen, waren vorher sterilisiert, ebenso wurde der Stickstoff zum Ausgasen der Proben durch ein steriles Wattefilter geleitet. Je nach zu untersuchender Abhängigkeit wurden die entsprechenden Mengen der Salzlösungen mit einer Spritze durch den Stopfen dem Schlamm zugegeben. Die zu insgesamt 2 ml fehlende Flüssigkeitsmenge wurde als steriles A. dest. zugefügt und leicht umgeschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Salze im Schlamm zu gewährleisten. Die so behandelten Proben wurden 5 min mit reinstem Stickstoff

ausgegast, 1 h im Schüttelwasserbad bei 25 °C im Dunkeln vorinkubiert, dann mit 3 ml Azetylen versetzt. Damit trat eine leichte Druckerhöhung im Inkubationsgefäß von 0,06 atm ein. Mit diesem Überdruck wurde verhindert, daß durch die Einstichkanäle im Serumstopfen Luft und damit Sauerstoff in die streng anaerob gehaltenen Proben eindringen konnte. Zu jeder Probenserie wurden frische Schlammproben entnommen. Zur Kontrolle und Korrektur der Meßergebnisse liefen sechs Vergleichs- bzw. Blindproben mit:

- 1.) sterilisierter Schlamm ohne Azetylen;
- 2.) sterilisierter Schlamm + 3 ml Azetylen;
- 3.) sterilisierter Schlamm + 3 ml C_2H_2 + 2 ml Salzlösung;
- 4.) normale Schlammprobe ohne Azetylen;
5. + 6.) mit Stickstoff ausgegaste normale Schlammproben, denen nur 3 ml Azetylen zugesetzt wurde, um die Reduktionsrate des unbehandelten Schlammes zu ermitteln.

Die gaschromatographische Untersuchung erfolgte nach 24, 48, 72 und 96 h Inkubationszeit. Die in den Blindproben gebildeten Mengen Äthylen wurden von den Meßproben subtrahiert. Von jeder Untersuchung wurden Doppelbestimmungen ausgeführt und Mittelwerte der Ergebnisse gebildet. Die Serumstopfen wurden nach jeder Versuchsserie verworfen, um bei neuen Proben Kontaminationen mit Äthylen auszuschließen (KAVANAGH & POSTGATE, 1970).

2.2.1. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von der Inkubationstemperatur

Diese Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, bei welcher Temperatur das Optimum der biologischen Stickstofffixierung liegt. Die serienmäßigen Untersuchungen wurden bei - 24 °C (Tiefkühltruhe); $\pm$ 0 °C (Eis- Wassergemisch); + 20 °C, + 25 °C, + 30 °C und + 40 °C (Schüttelwasserbäder) vorgenommen. Einzelne

Untersuchungsserien wurden auch bei höheren Temperaturen und zwar bei + 50 °C, + 60 °C und + 70 °C durchgeführt. Die zur Tiefkühlung vorgesehenen Proben wurden bei Zimmertemperatur mit Azetylen versetzt, 15 min leicht geschüttelt und anschließend eingefroren. Unmittelbar vor der gaschromatographischen Untersuchung wurden sie in einem 25 °C warmen Wasserbad aufgetaut, zur weiteren Inkubation wieder eingefroren.

2.2.2. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Ammoniumgehalt

Ammonium wurde als wässrige neutrale Ammoniumsulfatlösung in A. bidest. zugegeben. Orientierende Vorversuche wurden im Konzentrationsbereich zwischen 100 - 1000 mMol NH_4^+ /kg Schlamm durchgeführt, mit jeweils 100 mMol NH_4^+ Differenz. Die serienmäßigen Untersuchungen wurden bis zur oberen Konzentrationsgrenze von 400 mMol NH_4^+ /kg Schlamm durchgeführt. Dabei wurde dieser Konzentrationsbereich in 10 Stufen unterteilt.

2.2.3. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Nitratgehalt

Nitrat wurde als KNO_3 in neutraler Lösung in A. bidest. zugegeben. Die Untersuchungen wurden bis zu Gehalten von 5 mMol NO_3^- /kg, aufgeteilt auf 10 Konzentrationsstufen mit je 0,5 mMol NO_3^- Unterschied, durchgeführt.

2.2.4. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck

Das der zuzugebenden Sauerstoffmenge entsprechende Volumen Stickstoff wurde mit einer gasdichten Spritze entnommen und die gleiche Menge O_2 wieder zugegeben. Der Sauerstoff war ein für medizinische Zwecke verwandtes Gas mit einer garantierten Reinheit von 99,99 Vol%. Toxische Bestandteile waren nicht enthalten. Die Untersuchungen wurden mit folgenden pO_2

durchgeführt: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16; 0,18; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40 und 1,00 atm. Die letztgenannten Proben wurden nicht erst mit Stickstoff, sondern gleich 5 min mit Sauerstoff ausgegast.

2.2.5. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von Antibiotika-Zugaben

Bei den Untersuchungen zur Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck wurden bei pO_2 zwischen 0,12 und 0,20 atm sehr hohe Azetylenreduktionsraten festgestellt (verg. Abschnitt 7.). Es war zu prüfen, ob diese biogenen Ursprungs waren, oder durch chemische Reduktion des Azetylens vorgetäuscht wurden. Hierzu wurde der Schlamm mit den Antibiotika NEOMYCIN, STREPTOMYCIN und PENICILLIN, sowie einer Mischung dieser drei in verschiedenen Konzentrationen versetzt und die Azetylenreduktionsraten bei dem für aerobe diazotrophe Bakterien optimalen pO_2 von 0,10 und 0,14 atm ermittelt. Unter anaeroben Bedingungen wurden diese Untersuchungen nicht durchgeführt. Die hier verwandten Antibiotika umfassen in ihrem Wirkungsspektrum viele gram-positive und gram-negative Bakterien sowie Mikrokokken (PENICILLIN), außerdem noch Mycobakterien (STREPTOMYCIN, NEOMYCIN).

Die Antibiotika wurden als neutrale wässrige Lösungen in sterilem A. bidest. angesetzt und zu 5 g Schlamm 2 ml Lösung zugegeben. Die drei Antibiotika zusammen wurden als Mischung gleicher Teile der drei reinen Lösungen angesetzt. Es wurden drei Konzentrationsstufen mit je 10, 100 und 1000 mg Antibiotikum/l getestet.

2.3. Chemische und physikalische Methoden zur Wasser- und Schlammuntersuchung

2.3.1. Temperatur

Die Wassertemperatur wurde nach der Entnahme mit einem auf $1/10^{\circ}\text{C}$ geteilten und geeichten Laborthermometer gemessen, gleichzeitig mit einem trockenen Thermometer die Schattentemperatur am Entnahmeort ermittelt. Die Schlammtemperatur wurde vor dem Umfüllen im Bodengreifer ermittelt.

2.3.2. pH-Wert

Die Bestimmung des pH-Wertes im Schlamm direkt wie auch im wässrigen Auszug erfolgte mit einer geeichten pH-Elektrode (INGOLD). Das Anzeigegerät war ein Präzisions-Digital-pH-Meter Modell 701 der Fa. ORION.

2.3.3. Wassergehalt, Trockengewicht, Glührückstand, Glühverlust

Zur Ermittlung des Schlamm-trockengewichtes wurden etwa 20 g des homogenisierten Naßschlammes in einer bis zur Gewichtskonstanz ausgeglühten Porzellanschale eingewogen, über Nacht bei 110°C getrocknet, zum Erkalten in einen Exsiccator gestellt und dann ausgewogen. Das Gewicht des Naßschlammes wurde gleich 100% gesetzt und der Gewichtsverlust nach dem Trocknen, der dem ursprünglichen Wassergehalt entspricht, prozentual davon ausgerechnet. Der Glührückstand wurde aus der Trockensubstanz ermittelt, indem diese 2 h im Muffelofen auf 750°C erhitzt wurde. Das Auswiegen erfolgte wiederum nach Erkalten der Probe im Exsiccator. Bei der rechnerischen Auswertung wurde das Trockengewicht gleich 100% gesetzt und der Glührückstand darauf bezogen. Der Glühverlust ist die prozentuale Differenz von 100 - Glührückstand (%). (nach "DEV" S 2 und S 3, Nachweisgrenze: entfällt).

2.3.4. Ammonium und organisch gebundener Stickstoff

Unter organisch gebundenem Stickstoff versteht man den in organischen Verbindungen enthaltenen Stickstoff, der analytisch nicht als Nitrit-, Nitrat- oder Ammoniak-Stickstoff erfasst wird. Der organisch gebundene Stickstoff wird durch Kjeldahl-Aufschluß mit Selenreaktionsgemisch nach WIENINGER in NH_4^+ übergeführt, das als Ammoniak abdestilliert, in 0,1 n HCl aufgefangen und photometrisch als NH_4^+ bestimmt wird, wie weiter unten beschrieben. Der in den Proben enthaltene Ammoniak-Stickstoff wird vor Durchführung des Kjeldahl-Aufschlusses abgetrennt. Dazu wurden etwa 5 g Schlamm in einen 250 ml Rundkolben eingewogen, mit 25 ml Phosphat-Pufferlösung (0,5 M, pH 7,35) versetzt, auf ein Endvolumen von 150 ml mit A. dest. aufgefüllt, durch vorsichtiges Erhitzen der Ammoniak abdestilliert und in 5 ml 0,1 n HCl in einer mit A. dest. auf 20 ml aufgefüllten Vorlage aufzufangen. Die Destillation war nach 45 min abgeschlossen. Aus dem verbliebenen Rückstand wurde der organisch gebundene Stickstoff bestimmt. Dazu wurde er mit 10 ml H_2SO_4 ($d = 1,27$), 10 ml Na_2SO_3 -Lösung und 5 Tropfen 10%iger FeCl_3 -Lösung versetzt und auf ein Volumen von ca 20 ml eingedampft. Nach dem Abkühlen wurden 10 ml H_2SO_4 ($d = 1,84$), 1 ml CuSO_4 -Lösung (10%ig) sowie 3 g Selenreaktionsgemisch zugegeben. Die Probe wurde bis zur Entwicklung von weißen Schwefeltrioxidddämpfen erhitzt, dann ein Rückflußkühler auf den Reaktionskolben aufgesetzt und so lange weitererhitzt, bis der Rückstand eine deutlich grüne Farbe annahm. Damit war der Aufschluß beendet. Dies war bei starkem Erhitzen nach etwa 30 min der Fall. Nach dem Erkalten wurde der Rückstand mit A. dest. auf 100 ml aufgefüllt, Siedesteinchen und einige Tropfen 1%ige Phenolphthalein-Lösung zugegeben. Dann wurde mit 30%iger NaOH bis zum Umschlagspunkt des Indikators nach rot alkalisiert und der Reaktionskolben sofort mit der Vorlage verbunden,

da die NH_4^+ -Entwicklung im selben Augenblick einsetzt. Die Destillation war bei Auftreten des typischen "Klopfens" beendet.

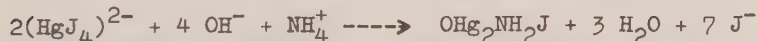
Analog wurde mit dem wässerigen Schlammauszug verfahren. Der Einsatz betrug hier 150 ml Lösung, zusätzlich 25 ml Phosphatpuffer. Alle Destillationen und Aufschlüsse wurden in einer Kjeldahl-Apparatur nach SCHLIERF durchgeführt. Bei beiden Bestimmungen lag also der Stickstoff als NH_4^+ vor. Die quantitative Bestimmung des Ammoniums wurde wie folgt durchgeführt: Die Vorlagen wurden auf 250 ml mit A. dest. aufgefüllt und folgende Einsätze entnommen:

NH_4^+ im Schlamm direkt:	50 ml;
NH_4^+ im wässerigen Auszug:	25 ml;
org. geb. N im Schlamm:	5 ml;
org. geb. N im wässerigen Auszug:	100 ml.

Die ersten drei Proben wurden in einem speziellen Meßzylinder auf 100 ml mit A. dest. aufgefüllt. Hierzu gibt man 2 ml Seignettesalz-Lösung (100 g Seignettesalz in 200 ml A. dest. + 10 ml NESSLER-Reagenz) zusätzlich nochmals 4 ml NESSLER-Reagenz. Nach einer Reaktionszeit von 10 min ist das Farbmaximum erreicht. Die auftretende Gelbfärbung wurde bei 436 nm gegen eine Blindprobe aus A. dest. mit Reagenzienzusatz im Spektralphotometer ausgemessen und die Extinktion ermittelt.

Prinzip:

Ammonium-Ionen bilden mit Dikaliumtetrajodomerkurat-II (= NESSLER-Reagenz) in alkalischem Medium ein Salz der Millon'schen Base, das gelbbraun gefärbte Oxidiquecksilberamidojodid:



Härtebildner und Eisen-Ionen würden durch NESSLER-Reagenz ganz oder teilweise ausgefällt, der Zusatz von Seignettesalz hält sie jedoch in Lösung.

(Verfahren nach "DEV" E 5 (NH_4^+) und H 11 (org.geb.N), Nachweisgrenze: 0,001 mg/l).

Berechnung:

Die rechnerische Auswertung erfolgte bei allen 4 Bestimmungen nach der Formel:

$$\frac{E \cdot F \cdot 1000}{K} = \text{NH}_4^+ \text{ in mg/kg Schlamm, bzw. in mg/l wässrigem Auszug.}$$

Es bedeuten:

$K = \frac{\text{ursprünglicher Einsatz} \cdot \text{Entnahme aus der Vorlage}}{\text{ml Vorlage (hier 250 ml)}}$;

$E =$ gemessene Extinktion;

$F =$ aus der Eichgeraden ermittelte Konstante, hier: 0,966.

Die Umrechnung auf organisch gebundenen Stickstoff erfolgte durch Multiplikation der aus den Kjeldahl-Aufschlüssen erhaltenen Ammoniumwerte mit 0,78. Diese Konstante ist der Umrechnungsfaktor $\text{NH}_4^+ \longrightarrow \text{NH}_4^+\text{-N}$.

Die im folgenden aufgeführten Bestimmungen sind nur aus einem wässrigen Auszug, bzw. in wässriger Lösung, durchführbar. Dazu wurden 100 g des homogenisierten Naßschlammes in einen Meßkolben eingewogen und mit A. dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Nach mehrmaligem Schütteln und 48 h Stehen im Dunkeln bei Zimmertemperatur wurde der Überstand abfiltriert, bis eine optisch klare Lösung vorlag.

Die photometrischen Messungen wurden mit einem ZEISS Spektralphotometer PM 6 durchgeführt. Alle nach der Extinktion angegebenen Konstanten wurden aus eigenen Eichgeraden ermittelt. Der zweite Multiplikationsfaktor gibt die Umrechnung des tatsächlichen Einsatzes auf 1000 ml an.

2.3.5. Nitrit

Vom wässrigen Auszug wurden 100 ml mit 5 ml 98%igem Eisessig und 5 ml Sulfanilsäure-a-Naphthol durchgemischt und nach 20 min Stehen bei 436 nm die Extinktion gegen A. dest. mit Reagenzienzusatz ermittelt.

Prinzip:

Das Verfahren beruht auf der Freisetzung von salpetriger Säure, die sich mit Sulfanilsäure zu einer Diazoverbindung umsetzt, welche mit α -Naphthol einen intensiv orangeroten Farbstoff bildet.

(Verfahren nach "EPPENDORF", Nachweisgrenze:

0,005 mg/l).

Berechnung:

$E_{436 \text{ nm}} \cdot 0,15 \cdot 10 = \text{NO}_2^-$ in mg/l.

2.3.6. Nitrat

Vom wässerigen Auszug wurden 10 ml in eine Abdampfschale pipettiert, mit einigen Tropfen 30%iger NaOH alkalisiert und 1 ml 0,5%ige Natriumsalicylat-Lösung zugegeben. Über Nacht wurde das Gemisch bei 80 °C im Trockenschrank eingedampft, der Rückstand mit 1 ml konz. H_2SO_4 versetzt, 10 min stehen gelassen, mit 6 ml A. dest. verdünnt, 10 ml 30%ige NaOH hinzugegeben und die Lösung auf 100 ml aufgefüllt. Die Extinktion der gelb gefärbten Lösung wurde bei 436 nm gegen eine gleich behandelte Blindprobe gemessen.

Prinzip:

Das nach dem Eindampfen in fester Form vorliegende Nitrat bildet mit konz. Schwefelsäure Salpetersäure, die auf gleichzeitig vorhandene Salicylsäure nitrierend wirkt. Die so gebildete Nitrosalicylsäure reagiert mit Natronlauge unter Bildung des gelb gefärbten Natriumnitrosalicylats.

(Verfahren nach "EPPENDORF", Nachweisgrenze: 0,1 mg/l).

Berechnung:

$E_{436 \text{ nm}} \cdot 0,715 \cdot 100 = \text{NO}_3^-$ in mg/l.

2.3.7. Gesamtstickstoff

Unter Gesamtstickstoff ist die Summe des in organischen und anorganischen Stickstoffverbindungen enthaltenen Stickstoffes zu verstehen.

Gesamt-N = NO_3^- -N + NO_2^- -N + NH_4^+ -N + org. geb. N

Berechnung:

$G = a \cdot 0,23 + b \cdot 0,30 + c \cdot 0,78 + d$

G = Gesamtstickstoff (mg/l);

a = Gehalt der Probe an Nitrat-Ionen (mg/l);

b = Gehalt der Probe an Nitrit-Ionen (mg/l);

c = Gehalt der Probe an Ammonium-Ionen (mg/l);

d = Gehalt der Probe an organisch gebundenem Stickstoff (mg/l).

Diese Berechnung konnte aus den oben dargestellten Gründen folgerichtig nur für den wässrigen Auszug vorgenommen werden, da im Schlamm direkt nur NH_4^+ und der organisch gebundene Stickstoff, nicht aber Nitrit und Nitrat bestimmt werden konnten.

(Verfahren nach "DEV" H 12, Nachweisgrenze: entfällt).

2.3.8. Sulfat

100 ml des wässrigen Auszuges wurden mit 1 ml konz. HCl versetzt und zum Sieden erhitzt. Dann wurden etwa 7 ml 10%ige BaCl_2 -Lösung zugegeben und bis zum Auftreten eines weißen Niederschlages weitererhitzt. Nach langsamem Abkühlen wurden die Proben durch aschefreie Blaubandfilter filtriert, getrocknet und bei 800 °C in bis zur Gewichtskonstanz ausgeglühten Porzellantiegeln im Muffelofen geglüht.

Prinzip:

Sulfat-Ionen bilden in salzsaurer Lösung mit Barium-Ionen einen schwer löslichen Niederschlag von Bariumsulfat, der gravimetrisch bestimmt wird.

(Verfahren nach "DEV" D 5, Nachweisgrenze: entfällt).

Berechnung:

(Tiegel + Bariumsulfat) - Tiegel (leer) = g in 100 ml Probe;

umrechnen auf mg durch Multiplikation mit 1000 = Wert a;

$a \cdot 0,4115 \cdot 10 = \text{SO}_4^{2-}$ in mg/l.

2.3.9. Phosphat

50 ml des wässerigen Auszuges wurden in einem Schüttelzylinder mit 1 ml 10%iger Zitronensäure-Lösung und 2 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung (18 g Natriumpyrosulfit auf 50 ml A. bidest.) gemischt. Dann wurden 4 ml 5%ige Ammoniumheptamolybdatlösung in 5%iger H_2SO_4 und 4 ml 2%ige "PHOTOREX"-Lösung (= 4-(Methylamino)-phenolsulfat) zugegeben, erneut umgeschüttelt und 30 min stehengelassen. Die Extinktion der blau gefärbten Lösung wurde bei 578 nm gegen eine gleich behandelte Blindprobe gemessen.

Prinzip:

Phosphorsäure bildet mit Ammoniummolybdat in saurer Lösung gelbe Phosphormolybdänsäure, die mit "PHOTOREX" und Natriumpyrosulfit zu Phosphormolybdänblau reduziert wird.

(Verfahren nach "EPPENDORF", Nachweisgrenze 0,01 mg/l).

Berechnung:

$$E_{578 \text{ nm}} \cdot 3,69 \cdot 20 = \text{PO}_4^{3-} \text{ in mg/l.}$$

2.3.10. Oxidierbarkeit

100 ml des wässerigen Auszuges wurden mit 5 ml Schwefelsäure ($d = 1,27$) versetzt und zum Sieden erhitzt. Dann wurden 15 ml n/100 KMnO_4 -Lösung zugegeben, 10 min unter Rückfluß auf kleiner Flamme eben am Sieden gehalten, 15 ml n/100 Oxalsäure-Lösung zugegeben und bis zur vollständigen Entfärbung der Lösung gewartet. Mit n/100 KMnO_4 -Lösung wurde dann bis zu einer eben beständigen Violettfärbung zurücktitriert.

Prinzip:

Viele organische und bestimmte anorganische Stoffe werden durch Kaliumpermanganat in saurer Lösung zu CO_2 und H_2O oxidiert und dabei das Permanganat-Ion zum Mn^{2+} reduziert. Da die Oxidation von der Art der Stoffe, der Konzentration des Oxidationsmittels, dem pH-Wert der Lösung, ihrer Temperatur und der Reaktionszeit abhängig ist, müssen alle Versuchsbedingungen immer genau einge-

halten werden. Der Überschuß an Oxalsäure, der dem Gehalt der Probe an organischer Substanz entspricht, wird mit Kaliumpermanganat zurücktitriert. (Verfahren nach "DEV" H 4, Nachweisgrenze: 1 mg/l).

Berechnung:

1 ml n/100 KMnO_4 -Lösung enthält 0,3161 mg KMnO_4 . Bei Anwendung von 100 ml Probenwasser ergibt die Anzahl verbrauchter ml KMnO_4 -Lösung (=Wert a) multipliziert mit 3,161 den Kaliumpermanganatverbrauch in mg/l. Dabei entspricht 1 mg KMnO_4 -Verbrauch/l = 5,25 mg/l organischer Substanz.

2.3.11. Elektrische Leitfähigkeit

Diese wurde mit einem Leitfähigkeitsmeßgerät Typ LF 54 der Fa. WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHE-WERKSTÄTTEN (WTW) direkt im wässrigen Auszug gemessen.

2.3.12. Gesamt-Eisen

50 ml des wässrigen Auszuges wurden mit A. dest. auf 100 ml aufgefüllt, mit 1 ml konz. HCl und einigen Tropfen 30%iger H_2O_2 -Lösung versetzt, anschließend durch Sieden auf die Hälfte eingedampft. Nach dem Erkalten wurde in einen 100 ml Meßkolben umgefüllt, mit 1 ml 16%iger Salzsäure, 0,5 ml 3%iger H_2O_2 -Lösung und 5 ml 10%iger Ammoniumrhodanidlösung versetzt und nach 5 min Stehen die Extinktion der rot gefärbten Lösung bei 436 nm gegen eine gleich behandelte Blindprobe gemessen.

Prinzip:

Eisen-III-salze ergeben mit Rhodaniden eine intensive Rotfärbung von Eisenrhodanid. Eisen-II-salze werden in saurer Lösung vorher durch Zugabe von H_2O_2 zu Eisen-III-salzen oxidiert.

(Verfahren nach "EPPENDORF", Nachweisgrenze: 0,01 mg/l).

Berechnung:

$E_{436 \text{ nm}} \cdot 1,01 \cdot 20 = \text{Fe}^{3+} \text{ in mg/l.}$

2.3.13. Kupfer

100 ml des wässrigen Auszuges wurden mit 10 ml konz. HCl und 10 ml 0,1%iger Zinkdibenzyledithiocarbamat-Lösung in CCl_4 versetzt und 1 min im Scheidetrichter kräftig geschüttelt. Die Extinktion der gelblich gefärbten organischen Phase wurde bei 436 nm gegen Tetrachlorkohlenstoff gemessen.

Prinzip:

Beim Ausschütteln einer kupferhaltigen Lösung mit Zinkdibenzyledithiocarbamat in CCl_4 geht das Kupfer als gelbes Kupferdibenzyledithiocarbamat quantitativ in die Tetrachlorkohlenstoffphase.

(Verfahren nach "EPENDORF", Nachweisgrenze: 0,0005 mg/l).

Berechnung:

$$E_{436 \text{ nm}} \cdot 0,0405 \cdot 10 = \text{Cu}^{2+} \text{ in mg/l.}$$

2.3.14. Mangan

100 ml des wässrigen Auszuges wurden mit 1 ml konz. H_2SO_4 , 1 ml konz. HNO_3 , 1 ml konz. H_3PO_4 versetzt und 1 g Kaliumperjodat zugegeben, 20 min bis zum Sieden erhitzt und abgekühlt. Die Lösung wurde auf 100 ml mit A. dest. aufgefüllt und die Extinktion der violett gefärbten Lösung bei 546 nm gegen A. dest. gemessen.

Prinzip:

Mangan wird in saurer Lösung durch Kochen mit Kaliumperjodat zu rot-violetter Permangansäure oxidiert. Durch Zusatz von Phosphorsäure wird eine mögliche Störung durch Eisen ausgeschaltet.

(Verfahren nach "ZIMMERMANN", Nachweisgrenze: 0,05 mg/l).

Berechnung:

$$E_{546 \text{ nm}} \cdot 2,38 \cdot 10 = \text{Mn}^{7+} \text{ in mg/l.}$$

2.3.15. Gesamt-Chrom

50 ml des wässrigen Auszuges wurden bis zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit Kaliumperchlorat und Kalium-/Natriumkarbonat (1:1:2) in einer Porzellanschale geschmolzen. Nach dem Erkalten wurde die Schmelze

in A. dest. aufgenommen, mit 10%iger H_2SO_4 neutralisiert und die Lösung auf 100 ml aufgefüllt. Danach wurde sie durch ein Faltenfilter filtriert, ein aliquoter Teil (hier 50 ml) mit 2,5 ml Diphenylcarbazidlösung sauer (0,2 g Diphenylcarbazid in 100 ml Äthanol gelöst und auf 500 ml mit 10%iger H_2SO_4 aufgefüllt) versetzt und mit A. dest. auf 100 ml aufgefüllt. Nach 10 min Stehen wurde die Extinktion der violett gefärbten Lösung gegen eine Blindprobe aus den Reagenzien bei 546 nm gemessen.

Prinzip:

Chromsäure ergibt mit Diphenylcarbazid in saurer Lösung eine violette Färbung. Die verschiedenen Wertigkeitsstufen des Chroms werden durch Schmelzen des Abdampfrückstandes mit einer Alkalikarbonat-Perchlorat-Mischung in Chromat (= Cr^{6+}) überführt.

(Verfahren nach "EPFENDORF", Nachweisgrenze: 0,002 mg/l).

Berechnung:

$$E_{546 \text{ nm}} \cdot 0,383 \cdot 40 = \text{CrO}_4^{2-} \text{ in mg/l.}$$

2.4. Die bakteriologische Untersuchung des Schlammes

Sämtliche Arbeitsgänge wurden unter dem bei mikrobiologischen Arbeiten üblichen Sterilitätsgebot durchgeführt, so daß im folgenden nicht mehr ausdrücklich darauf hingewiesen wird. Von der homogenisierten Schlammprobe wurden 4 x je 1 g in 100 ml Meßkolben eingewogen. Die Extraktion der Bakterien aus dem Schlamm zur Bestimmung der verschiedenen Keimzahlen wurde mit folgenden Elutionsmitteln ausgeführt:

- 1.) Destilliertes Wasser;
- 2.) Physiologische Kochsalzlösung 0,9%ig pH 7,00;
- 3.) TRIS-Puffer 0,05 M pH 7,20;
 (= TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan/HCl-Puffer)
- 4.) Phosphatpuffer 0,025 M pH 6,88.

Die Schlammproben wurden mit diesen Lösungen aufgefüllt, 2 h mäßig bei Zimmertemperatur geschüttelt, dann 1/2 h zum Sedimentieren ruhig stehen gelassen.

Die Filtration der Proben erwies sich als nachteilig, da die Bakterienzahlen hier durch Adsorption sowohl an Papierfilter, wie auch an Glaswolle, geringer ausfielen. 10 ml wurden mit einer Pipette vorsichtig abgezogen, in Kapsenberg-Röhrchen umgefüllt und mit den gleichen Elutionsmitteln folgende Verdünnungsreihen angesetzt:

<u>Probe Nr.</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Probe Nr.</u>	<u>Verdünnung</u>
0	unverdünnt	5	1 : 2000
1	1 : 10	6	1 : 4000
2	1 : 100	7	1 : 6000
3	1 : 500	8	1 : 8000
4	1 : 1000	9	1 : 10000

2.4.1. Die Bestimmung der Koloniezahl (früher "Gesamtkeimzahl")-----

"Als Koloniezahl wird die Zahl der mit 8-facher Lupenvergrößerung sichtbaren Kolonien bezeichnet, die sich aus den in 1 ml des zu untersuchenden Wassers befindlichen Bakterien in Plattenkulturen mit nährstoffreichen, peptonhaltigen Nährböden bei einer festgelegten Bebrütungstemperatur (hier: 37 °C) innerhalb einer bestimmten Zeit (hier: 48 h) entwickeln" ("DEV" K 5, S. 1). Wenn auch die Koloniezahl nicht unbedingt zahlenmäßig mit der Gesamtzahl entwicklungsfähiger Keime übereinstimmen muß, so ergibt sie doch ein hinreichend genaues Bild der bakteriologischen Belastung einer Probe. Zur Wahl der geeigneten Bebrütungstemperatur ist anzumerken, daß die alimentär in das Wasser gelangenden, wie auch die Keime aus den oberen Bodenschichten und Oberflächengewässern als thermophile Arten einzustufen sind, die am besten bei 37 °C zu züchten sind.

Je 1 ml der Verdünnungsstufen 1 : 10 und 1 : 100 wurden in Petrischalen pipettiert und nach dem KOCH'schen Plattengußverfahren mit Standardagar vermischt.

Dieser enthielt in 1 l dest. Wasser:

3 g Fleischextrakt, 5 g Natriumchlorid,
10 g Pepton, 15 g Agar-Agar;
nach dem Kochen Einstellen des pH-Wertes auf 7,2-7,5.

Die Koloniezahlen wurden zunächst auf 1 ml Wasserprobe umgerechnet und aus beiden Verdünnungsstufen der Mittelwert gebildet.

2.4.2. Die Bestimmung von ESCHERICHIA COLI und coliformen Bakterien-----

ESCHERICHIA COLI kommt nur im Darm von Mensch und warmblütigen Tieren vor und ist damit ein echter Fäkalindikator. Die coliformen Bakterien können fäkalen Ursprungs sein, ihren Hauptvermehrungsort haben sie aber im Oberflächenwasser und in den oberflächennahen Bodenschichten. Als "coliform" werden diejenigen Bakterien aus der Familie der Enterobacteriaceen bezeichnet, die bei 37 °C Lactose unter Gasbildung vergären können. Sie gehören den Gattungen CITROBACTER, ENTEROBACTER und KLEBSIELLA an. Als Differenzierungsmerkmal von ESCHERICHIA COLI neben den coliformen Keimen gilt die Milchzuckerzersetzung auch bei 44 °C innerhalb von 48 h. Die hier angewandte Bebrütungstemperatur von 44 °C (24 h), die weit über dem Temperaturoptimum der normalen Keime liegt, verhindert weitgehend ihr Anwachsen.

Allen ESCHERICHIA COLI und coliformen Keimen gemeinsam ist die Fähigkeit, auf fuchsinhaltigem ENDO-Agar Kolonien mit einem typisch grünen Metallglanz zu bilden, der auch bei längerem Aufbewahren der Platten beständig ist. Er beruht auf der Säurebildung aus Milchzucker, eine Spezialität, die andere Bakterien nicht aufweisen. Der pH-Wert in unmittelbarer Umgebung der Bakterien sinkt dabei auf unter 5,2 ab. Unter diesem Einfluß wird der bei einem pH-Wert zwischen 7,4 - 7,5 leicht rosa gefärbte Nährboden angesäuert, wobei sich seine Farbe nach dunkelrot mit metallisch grünem Glanz verändert. Obwohl die hier angewandte Membranfilter-

methode mit Nährkartonscheiben nach ENDO etwas unspezifisch auf *ESCHERICHIA COLI* und coliforme Keime ist, wurden keine weiteren differentialdiagnostischen Testverfahren durchgeführt. Je 1 ml der unverdünnten Ausgangsproben wurde zur besseren Verteilung der Bakterien mit einer größeren Menge sterilem A. dest. vermischt und anschließend mittels SARTORIUS-Membranfiltergerät abfiltriert. Da dieses Verfahren weithin geläufig und standardisiert ist, soll nicht näher darauf eingegangen werden.

2.4.3. Die Bestimmung der fakultativen und obligaten Anaerobier

Die Methoden zum Anzüchten der Anaerobier sind sehr vielfältig, die gebräuchlichsten sind die "Kultur in hoher Schicht", die Bindung des Sauerstoffs in einer chemischen Reaktion, oder das Ausgasen der Proben mit Stickstoff oder Edelgasen. Eine vierte Methode läuft darauf hinaus, ein bestimmtes Redoxpotential im Nährmedium zu schaffen, das die Entwicklung der Anaerobier auch unter aeroben Bedingungen ermöglicht. Dies wird erreicht durch Zusatz reduzierender Substanzen zur Nährlösung, z.B. von 0,5% Natriumformiat, 1% Cystein-Chlorhydrat oder 0,1% Natriumthioglycolat. Der gebrauchsfertige Thioglycolat-Bouillon der Fa. MERCK enthält pro Liter:

Pepton aus Casein:	15,0 g;	Hefeextrakt:	5,0 g;
L(+) Cystein:	0,5 g;	Natriumchlorid:	2,5 g;
D(+) Glucose:	5,5 g;	Natriumthioglycolat:	0,5 g.
pH-Wert des gebrauchsfertigen Bouillons: 7,0 - 7,2.			

Kapsenberg-Röhrchen wurden zu $\frac{3}{4}$ mit dem frisch bereiteten Bouillon gefüllt und anschließend autoklaviert. Die Beimpfung erfolgte in der Weise, daß von jeder Verdünnungsstufe 1 ml mit einer Pipette entnommen, diese bis auf den Boden der Kapsenberg-Röhrchen mit dem Bouillon geführt und unter Ausfließen der Lösungen langsam herausgezogen wurden. Der Thioglycolat-Bouillon

durfte dann nicht mehr geschüttelt werden. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 30 °C. Die Auswertung wurde aus den milchig trüben Proben vorgenommen. Aus der Stufe, die bakterienfrei und damit optisch klar war, wurde die anaerobe Keimzahl pro ml bestimmt.

Die Umrechnung der Untersuchungsergebnisse

Es wurde bereits erwähnt, daß je 1 g Schlammprobe in 100 ml Elutionsmittel angesetzt wurde. Da von diesem Ausgangsvolumen nur 1 ml oder ein Bruchteil davon zur Untersuchung kam, wurden die auf 1 ml Lösung berechneten Bakterienzahlen noch mit einem Faktor 100 multipliziert und ihre Zahl pro Gramm Schlamm angegeben (vergl. Tab. 21).

2.5. Die biologische Untersuchung des Wasserkörpers

Das freischwimmende Zoo- und Phytoplankton im Harkortsee wurde vom Bootssteg bzw. von einem Boot aus mittels Planktonnetz nach HÖLL (Maschenweite 28 μ) angereichert, indem etwa 50 l Wasser filtriert wurden. Seston oder Benthos wurde nicht entnommen. Die Proben wurden nach Aufschütteln in 25 ml fassende Planktonröhrenkammern eingefüllt und über Nacht im Kühlschrank zum Sedimentieren ruhig aufbewahrt. Vergleichsproben wurden mit 3 Tropfen LUGOL'scher Lösung fixiert, da zu befürchten war, daß gasvakuolenbildende Organismen, insbesondere Blaualgen, nicht sedimentieren würden. Es sei hier vorweggenommen, daß diese Befürchtung unbegründet war. Es ergab sich im Vergleich der fixierten mit den unbehandelten Proben keine Verschiebung des Artenspektrums und auch keine Verschiebung der Artenhäufigkeit. So wurde schließlich auf die Fixierung verzichtet und nur lebendes Plankton bei der Auswertung berücksichtigt. Die Sichtung der Proben erfolgte mit einem umgekehrten Mikroskop (ZEISS STANDARD UPL) mit Vergrößerungen von 100 - 600 fach. Die Organismen wurden in Anlehnung an die "DEV" mit sieben relativen Häufigkeitsstufen angegeben. Die Gliederung in Tab. 8 erfolgte nach steigender Saprobität der

Leitorganismen und im aufsteigenden Pflanzensystem (nach FOTT, 1971). Zum Schluß wurden die heterotropen Bakterien und Ciliaten aufgeführt. Die rechnerische Auswertung erfolgte so, daß zunächst die relativen Häufigkeiten innerhalb der einzelnen Saprobitätsstufen addiert wurden, Σos , ΣBms , Σams , Σps , sodann die Gesamtsumme der relativen Häufigkeiten

$\Sigma(ps + ams + Bms + os)$ gebildet wurde. Gehörte dabei ein Organismus verschiedenen Saprobitätsstufen an, so wurden die für ihn angesetzten Indikatoreinheiten sinngemäß auf die entsprechenden Teilsummen verteilt. Die Berechnung des Saprobienindex S erfolgte nach der Formel:

$$S = \frac{4 \cdot \Sigma ps + 3 \cdot \Sigma ams + 2 \cdot \Sigma Bms + 1 \cdot \Sigma os}{\Sigma(ps + ams + Bms + os)} \quad (\text{nach "DEV" M 7}).$$

Der Saprobienindex ist eine dimensionslose Zahl, die nur Werte zwischen 1 und 4 annehmen kann. Er repräsentiert die an der Entnahmestelle herrschende Gewässergüte.

Die "biologisch wirksame Belastung I" errechnet sich aus der Besiedlungstabelle nach der Formel:

$$\frac{\Sigma(ps + ams)}{\Sigma(ps + ams + Bms + os)} \cdot 100 = I (\%)$$

(nach "DEV" M 7).

Dieser Quotient beschreibt, ohne Rücksicht auf die Besiedlungsdichte, den Anteil der Indikatororganismen für stark und übermäßig stark verschmutztes Wasser an der jeweiligen Gesamtbesiedlung. Dabei besagt $I = 0\%$, daß sämtliche Leitformen dem reineren Wasser angehören, bzw. $I = 100\%$, daß alle Leitformen dem stark und übermäßig stark verschmutzten Wasser zuzurechnen sind.

Der biologisch-ökologische Gütezustand des Harkortsees wurde grafisch dargestellt (siehe Abb. 9).

Dazu wurden die Teilsummen Σps , Σams , ΣBms , Σos im I. und IV. Quadranten eines Koordinatensystemes aufgetragen und zwar die relativen Häufigkeiten der einzel-

nen Saprobitätsstufen auf der Ordinate, die Daten der Probenentnahmen auf der Abszisse.

- 1.) ΣBms als positiver Y-Wert nach oben, dann
- 2.) Σos als positiver Y-Wert additiv über Bms .
- 3.) Σams als negativer Y-Wert nach unten und
- 4.) Σps als negativer Y-Wert additiv unter ams
(nach "DEV" M 7).

Die korrespondierenden Punkte wurden miteinander verbunden, die vier entstandenen Felder durch Schraffur hervorgehoben. Man hat so stufenlos den jeweiligen biologischen Gütezustand eines Gewässers in Abhängigkeit von der Jahreszeit. Die Gesamt-Y-Werte zu jedem Probenentnahmedatum sind gleichzeitig ein Maß für die Gesamtbesiedlungsdichte.

2.6. Das Untersuchungsgebiet

Der Harkortsee wird auch als "Flußkläranlage Wetter" bezeichnet. Eine Lageskizze des Sees mit den Probeentnahmestellen zeigt Abb. 5. Die wichtigsten Daten sind im folgenden zusammengestellt:

- | | |
|--|---|
| 1.) Eigentümer: | Ruhrverband Essen |
| 2.) Stromgebiet: | Rhein |
| Flußgebiet: | Ruhr |
| 3.) Bauzeit: | 1929 - 1931 |
| 4.) Inbetriebnahme: | 1931 |
| 5.) Länge: | 3,2 km |
| 6.) mittlere Breite: | 430 m |
| 7.) mittlere Tiefe: | 2,60 m |
| 8.) Seeoberfläche: | $1,4 \cdot 10^6 \text{ m}^2$ |
| 9.) Wasserinhalt nach Inbetriebnahme: | $3,2 \cdot 10^6 \text{ m}^3$
dies entspricht 0,15% des jährlichen Durchflusses.
Der Inhalt wird möglichst gefüllt gehalten. |
| Wasserinhalt nach neuester Peilung des Ruhrverbandes 1973: | $2,3 \cdot 10^6 \text{ m}^3$
Verringerung des Volumens durch Schlammablagerungen. |

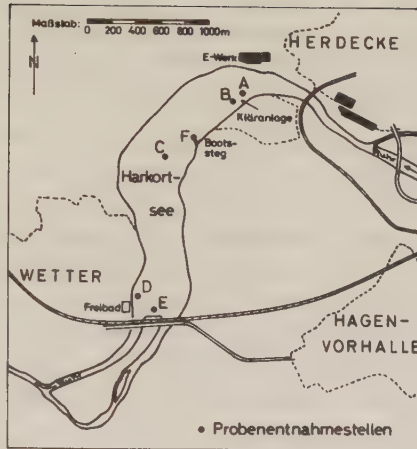


Abb. 5: Der Harkortsee im Mittellauf der Ruhr.

- A - F : Probenentnahmestellen;
 A : See oberhalb Einleitung der Kläranlage Hagen;
 B : See unterhalb Einleitung der Kläranlage Hagen;
 C : Seemitte;
 D : See am Bootsanleger Wetter;
 E : See am unteren Ende in Höhe des Wehres;
 F : Bootssteg am Campingplatz;
 (Maßstab 1:25000).

- | | |
|--|---------------------------------------|
| 10.) Einzugsgebiet der Ruhr bis zum Wehr d. Harkortsees: | 3853 km ² |
| 11.) mittlere Jahreswasserfracht der Ruhr insgesamt: | 2189 · 10 ⁶ m ³ |
| 12.) mittlere jährliche Niederschlagsmenge: | 1027 mm |
| 13.) Verschlußkörper: | 4 Walzenwehre |
| 14.) Stauziel: | + 89,3 m über NN |
| 15.) Stauhöhe über Talsohle: | 4,80 m am Wehr im Oberwasser |
| 16.) Zweck: | |
| a) Flußkläranlage zur Reinhaltung der Ruhr. Förderung der biologischen Selbstreinigung der Ruhr durch Vergrößerung der Wasseroberfläche und Begünstigung der Sauerstoffaufnahme. | |
| b) Schlammabseitung aus der Ruhr. | |

- c) Gewinnung von elektrischer Energie.
- d) Ableitung von Flußwasser in Versickerungsbecken zur Grundwasseranreicherung zu Trinkwasserversorgungszwecken.
- e) Bereitstellung von Kühlwasser für das Elektrokraftwerk Mark.
- f) Freizeitzentrum, Wassersport.

17.) Schlammverhältnisse am Seeboden:

Etwa 70% des Seebodens sind von Schlamm bedeckt. Keine Schlammablagerungen finden sich im alten Flußbett der Ruhr. Die Dicke der Schlammschicht schwankt von etwa 15 bis 100 cm. Die mächtigsten Schlammablagerungen finden sich in den stillen Uferzonen ohne nennenswerte Strömung. Die Dichte des Schlammes beträgt an seiner Oberfläche im Mittel 1,44 g/ml, so daß die gesamten Schlammablagerungen mit $1,296 \cdot 10^6$ t zu veranschlagen sind.

18.) Zuflußmengen:

HQ : Höchster Wert innerhalb der Jahresreihe 1941 - 1970:	1740 m ³ /sec;
MHQ: Mittelwert aus den Jahreshöchstwerten der Jahresreihe 1941 - 1970:	753 m ³ /sec;
MQ : Mittelwert des Gesamtabflusses von 1941 - 1970:	67,8 m ³ /sec;
MNQ: Mittelwert Jahresniedrigstwerte der Jahresreihe 1941 - 1970:	10,9 m ³ /sec;
NQ : Niedrigster Wert in den Jahren 1941 - 1970:	3,0 m ³ /sec.

Die aus der Kläranlage Hagen-Vorhalle eingeleitete Abwassermenge betrug im Untersuchungszeitraum bei Trockenwetter 910 l/sec, das entsprach einer Abwassermenge von $38,733 \cdot 10^6$ m³/a. Dies waren 1,31% der mittleren Jahreswasserfracht der Ruhr.

3. Charakteristik des Harkortsees

3.1. Biologische, bakteriologische und chemische Befunde des Wasserkörpers und Schlammes an verschiedenen Stellen (A-E) des Harkortsees

Die Probenentnahmen wurden durch die freundliche Unterstützung des Ruhrverbandes ermöglicht, der ein Motorboot zum Befahren des Sees zur Verfügung stellte. Die Wasser- und Schlammproben wurden am 15.7.74 bei trockener Witterung entnommen. Die Probenentnahmestellen sind aus Abb. 5 ersichtlich. Die biologischen Proben zur Bestimmung des Saprobienindex (Tab. 1) wurden von der Seeoberfläche entnommen. Mit einer Schöpfflasche nach RUTNER wurden unmittelbar über dem Seeboden Wasserproben gezogen, die chemisch analysiert wurden (Tab. 2) und mit dem Bodengreifer Schlammproben entnommen, die ebenfalls chemisch untersucht und deren Azetylenreduktionsraten unter anaeroben Bedingungen ohne Chemikaliengzusätze bestimmt wurden (Tab. 3). Die Untersuchung des Wasserkörpers sollte Aufschluß darüber geben, ob der Harkortsee gleichmäßig eutrophiert ist, oder Unterschiede an den verschiedenen Probenentnahmestellen festzustellen sind. Die Untersuchung der Schlammproben sollte zeigen, ob der für die Routineuntersuchungen wöchentlich vom Bootsanleger am östlichen Ufer entnommene Schlamm repräsentativ für den am Seeboden abgelagerten Schlamm ist.

Der Saprobienindex (Tab.1) zeigt an der Stelle A mit 2,4 Indexeinheiten einen Belastungszustand an, der seit etwa 10 Jahren konstant geblieben ist. Der See ist an seinem oberen Ende mäßig bis stark belastet. Unterhalb der Einleitung der Kläranlage (Stelle B) steigt die Belastung an. Dies ist mehr an der biologisch wirksamen Belastung als am Saprobienindex festzustellen. Insbesondere das Vorhandensein von Spirillen, SPHAEROTILUS NATANS und Nematoden zeigt die fäkalische Verunreinigung des Sees an. An den Stellen C - E ist eine allmähliche Verbesserung der Wasserqualität

Tab. 1: Die Bestimmung des Saprobienindexes an den Entnahmestellen A - E im Harkortsee am 15.7.1974.

Die Zahlen 1 - 7 entsprechen den relativen Häufigkeiten der vorgefundenen Organismen:
1: Einzelfund; 2: wenig; 3: wenig bis mittel;
4: mittel; 5: mittel bis viel; 6: viel;
7: massenhaft.

Organismen	Saprobien-Stufe	Entnahmestellen				
		A	B	C	D	E
<i>Asterionella formosa</i>	os-Sms	6	5	6	6	6
<i>Melosira varians</i>	Sms		3	2	2	2
<i>Synedra ulna</i>	Sms	4	3	3	4	4
<i>Synedra acus</i>	Sms	3	3		4	4
<i>Navicula spec.</i>	Sms	4	3	4	4	2
<i>Cymbella ventricosa</i>	Sms	2		2	2	
<i>Diatoma vulgare</i>	Sms	2	3	3		3
<i>Fragilaria crotonensis</i>	Sms					2
<i>Scenedesmus longispina</i>	Sms	6	4	5	6	5
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Sms	6	5	6	6	6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Sms	2	2	2	3	2
<i>Pediastrum boryanum</i>	Sms	4	3	4	5	4
<i>Pediastrum duplex</i>	Sms	3	3	3	4	4
<i>Staurostrum planctonicum</i>	Sms	2	3	4		3
<i>Aktinastrum hantzschii</i>	Sms				3	3
<i>Microactinium pusillum</i>	Sms			2		
<i>Closterium moniliferum</i>	Sms				2	3
<i>Stentor polymorphus</i>	Sms					2
<i>Keratella quadrata</i>	Sms			2		
coccale Grünalgen	Sms-ams	6	6	6	6	6
<i>Gonium pectorale</i>	Sms-ams	3	2		3	
<i>Stephanodiscus spec.</i>	ams	4	7	5	5	4
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	ams	2	4	3	4	4
<i>Closterium acerosum</i>	ams			2		
kl. heterotrophe Flagellaten	ams	3	3	2	2	2
<i>Anthophysis vegetans</i>	ams	4	4	3	3	2
<i>Vorticella convallaria</i>	ams			2		
<i>Carchesium polypinum</i>	ams					3
<i>Opercularia coarctata</i>	ams		2			
<i>Amoeba limax</i>	ams-ps	2		2		
Nematoden	ams-ps		2			
<i>Zoogloea ramigera</i>	ps	3	4	4	4	3
Spirillen	ps		2			
<i>Sphaerotilus natans</i>	ps		3			
Saprobienindex		2,4	2,5	2,4	2,3	2,3
Biologisch wirksame Belastung (%)		34	44	34	31	29
Coli - Keimzahl /ml (ENDO 44 °C, 24 h)		50	520	15	25	20
Koloniesahl · 10 ³ /ml (Agar 37 °C, 48 h)		22	491	17	14	27

festzustellen, was in der biologisch wirksamen Belastung deutlich zum Ausdruck kommt. Sie sinkt an Stelle E im Vergleich zur Stelle B um 15% ab. Hieraus ist zu ersehen, daß der Harkortsee seiner Funktion als Flußkläranlage gerecht wird.

Die chemische Untersuchung des Wasserkörpers (Tab. 2) zeigt größere Unterschiede in der Wassertemperatur. Dies ist auf die Einleitung von erwärmtem Kühlwasser durch das CUNO-Kraftwerk der ELEKTROMARK zurückzuführen.

Tab. 2: Die chemische Untersuchung des Wasserkörpers im Harkortsee an den Entnahmestellen A - E am 15.7.1974.

	Entnahmestellen					Mittelwert	Standardabweichg. (s.d.)	Standardabweichg. (K)
	A	B	C	D	E			
mittlere Wassertiefe (m)	80	85	86	95	150			
Wassertemperatur (°C)	16,8	17,2	19,6	18,1	17,7			
pH-Wert	7,5	7,5	7,4	7,4	7,5	7,5		
elekt. Leitfähigkeit ($\mu S \cdot cm^{-1}$)	250	250	240	240	250	246	3,5	2,24
Sauerstoffgehalt (mg O ₂ /l)	8,3	7,7	7,5	7,5	7,4	7,6	0,4	5,26
Sauerstoffsättigung (%)	88	83	84	80	80	83	3,3	3,98
Sauerstoffkonz. H ₂ O ₂ (mg O ₂ /l)	1,9	4,1	3,7	3,3	4,2	3,4	0,9	26,47
Oxidierbarkeit (mg KMnO ₄ -Verbr./l)	22	57	110	82	90	72	34	47,22
Sulfat (mg/l)	29	31	31	32	34	31	1,9	6,13
Gesamthärte (°dH)	72	122	68	74	75	82	22	26,83
Nitrit (mg/l)	7,5	7,9	7,7	7,4	7,5	7,6	0,26	3,42
NO ₂ - N (mg/l)	0,19	0,21	0,23	0,23	0,24	0,22	0,02	9,09
Nitrat (mg/l)	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07			
NO ₃ - N (mg/l)	6,7	6,4	5,9	4,6	6,2	6,0	0,82	13,67
Ammonium (mg/l)	1,3	1,5	1,4	1,1	1,4			
NH ₄ ⁺ - N (mg/l)	0,82	1,40	1,10	0,63	1,30	1,05	0,32	30,46
org. geb. N. (mg/l)	0,64	1,10	0,86	0,49	1,00			
Gesamtstickstoff (mg/l)	1,6	1,9	--	2,6	2,2	2,1	0,43	20,48
Gesamt-Eisen (mg/l)	3,8	4,5	--	4,3	4,6	4,3	0,36	8,37
Kupfer (mg/l)	0,15	0,18	0,33	0,15	0,45	0,25	0,13	
Mangan (mg/l)	0,024	0,015	0,028	0,023	0,160	0,05	0,06	
Gesamt-Chrom (mg/l)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.			

Die Warmwasserfahne zieht bevorzugt auf der rechten Seeseite zum unteren Ende, wo sie sich flächig ausbreitet. An der im weiteren benutzten Probenentnahmestelle F, die fast genau gegenüber der Einleitungsstelle liegt, macht sich das erwärmte Wasser nicht bemerkbar. An Hand der chemischen Parameter ist an den Stellen C - E im Wasserkörper nur eine leichte Qualitätsverbesserung festzustellen.

Größere Unterschiede zeigen sich in der Chemie und den Azetylenreduktionsraten der verschiedenen Schlammproben. Hierbei fallen die starke organische Belastung des Schlammes wie auch die hohen Azetylenreduktionsraten an den Stellen A und B um die Einleitung der Kläranlage auf (Tab. 3). Diese beiden Stellen sind jedoch nur von einem Boot aus zugänglich, so daß sie für die Routineuntersuchungen nicht in Frage kamen. Mit zunehmender Entfernung der Probenentnahmestellen von der Einleitung der Kläranlage nimmt die organische Belastung des Schlammes ab. Auf den deutlichen Zusammenhang von Azetylenreduktion, Ammoniumgehalt und organisch gebundenem Stickstoff wird in den Abschnitten 3.2. und 3.4. eingegangen.

Tab. 3: Vergleich der chemischen Untersuchungsbefunde mit den Azetylenreduktionsraten im Schlamm des Harkortsees an den Entnahmestellen A - F am 15.7.1974.

	Entnahmestellen					MW	S ±		S (K)	11.7.74
	A	B	C	D	E	A - E	A - E			
I. Schlamm direkt										
Schlammtemperatur (°C)	16,7	17,0	19,1	18,7	18,9					
pH-Wert	6,7	6,7	6,9	7,0	6,9	6,8				
Wassergehalt (%)	62,5	67,6	70,6	71,1	72,2	68,8	3,9	5,67		7,3
Trockengewicht (%)	37,5	32,4	29,4	28,9	27,8	31,2	3,9			34,6
Glührückstand (%) der TS	82,4	84,4	80,6	86,3	67,3	80,2	7,5	9,35		84,1
Glühverlust (%) der TS	17,6	15,6	19,4	13,7	32,7	19,8	7,5			15,9
Ammonium (mg/kg)	265	254	120	84	140	173	82	47,40		152
NH ₄ ⁺ - N (mg/kg)	204	198	94	66	109					119
mMol NH ₄ ⁺	14,6	14,0	6,6	4,6	7,7					8,4
org. geb. N (mg/kg)	1900	1715	1210	1280	1325	1486	303	20,39		1510
II. Wasseriger Auszug des Schlammes (Einwaage: 100 g Schlamm auf 1.000 ml A. dest.)										
Ammonium (mg/l)	15,0	10,4	6,5	4,8	8,4	9,0				6,3
NH ₄ ⁺ - N (mg/l)	11,7	8,1	5,1	3,7	6,6					4,9
org. geb. N. (mg/l)	1,5	1,6	1,3	1,6	2,2	1,6	0,34	21,25		3,7
Nitrit (mg/l)	0,07	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03				0,03
O ₂ - N (mg/l)	0,02	0,009	0,006	0,006	0,009					0,009
Nitrat (mg/l)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.					
Gesamtstickstoff (mg/l)	13,2	9,7	6,4	5,3	8,8	8,7	3,1	35,63		8,6
Oxidierbarkeit (mg DmO ₂ -Verbr./l)	27	21	20	21	17	21	4	19,05		26
Leitfähigkeit (µS·cm ⁻¹)	200	125	130	95	115	133	42	31,58		
pH-Wert	7,6	7,6	7,4	7,6	7,5	7,5				7,9
Gesamt-Eisen (mg/L)	0,32	0,34	0,16	0,34	0,38	0,31	0,09			0,18
Kupfer (mg/l)	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02				0,02
Mangan (mg/l)	n.n.	n.n.	0,04	n.n.	Spuren	Spuren				0,01
Gesamt-Chrom (mg/l)	n.n.	n.n.	n.n.	0,26	0,21					n.n.
III. Acetylenreduktion										
n. 24 h	nMol C ₂ H ₄ /kg Schlamm	7543	6041	3516	2002	3912				4608
	Red.-Rate (nMol C ₂ H ₄ ·h ⁻¹ ·xkg ⁻¹)	314,3	251,7	146,5	83,4	163,0				192,0
n. 48 h	nMol C ₂ H ₄ /kg Schlamm	12756	10191	5791	3639	7325				7303
	Red.-Rate (nMol C ₂ H ₄ ·h ⁻¹ ·xkg ⁻¹)	217,2	172,9	94,8	68,2	142,2				112,3
n. 72 h	nMol C ₂ H ₄ /kg Schlamm	15367	13769	7543	4712	9207				9317
	Red.-Rate (nMol C ₂ H ₄ ·h ⁻¹ ·xkg ⁻¹)	108,8	149,1	73,0	44,7	78,4				83,9
n. 96 h	nMol C ₂ H ₄ /kg Schlamm	17325	14832	8393	6195	10894				10102
	Red.-Rate (nMol C ₂ H ₄ ·h ⁻¹ ·xkg ⁻¹)	81,6	44,3	35,4	61,8	70,3				32,7

Bildet man die Mittelwerte der Untersuchungsergebnisse für die Stellen A - E und vergleicht diese mit den Ergebnissen an der Entnahmestelle F so ist festzustellen, daß die Werte weitgehend einander entsprechen, d.h. der vom Bootssteg aus entnommene Schlamm ist repräsentativ für den auf dem Seeboden abgelagerten Schlamm. Es handelt sich nicht um einen organisch hochbelasteten Schlamm, wie er um die Einleitungsstelle der Kläranlage angetroffen wurde, aber auch nicht um einen nur gering bis mäßig belasteten Schlamm, wie er für die Entnahmestelle D charakteristisch ist. Seine Belastung liegt in der Mitte zwischen diesen beiden Extremen.

3.2. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom natürlichen Ammoniumgehalt des Schlammes an verschiedenen Stellen des Harkortsees

Die chemischen Untersuchungsbefunde des Schlammes und seine anaeroben Azetylenreduktionsraten sind aus Tab. 3 bzw. Abb. 6 ersichtlich.

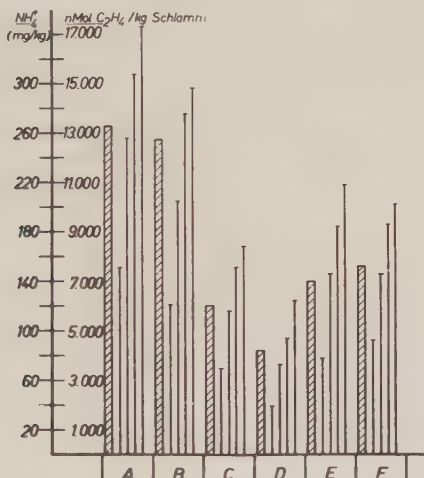


Abb. 6: Der Ammoniumgehalt des Schlammes und seine Azetylenreduktionsrate an verschiedenen Entnahmestellen im Harkortsee. A - F : Probenentnahmestellen (vergl. Abb. 5)



: Ammoniumgehalt (mg/kg)



: Azetylenreduktionsrate (nMol C_2H_4 /kg Schlamm) von links nach rechts nach 24, 48, 72 und 96 h Inkubationszeit.

Es war eine deutliche Abhängigkeit des NH_4^+ -Gehaltes im Schlamm von der Entfernung der Entnahmestelle zur Einleitung der Kläranlage festzustellen. Je weiter die Probenentnahmestellen hiervon entfernt waren, desto geringer war der Ammoniumgehalt. Die geringsten Werte wurden am Bootanleger Wetter (Stelle D) ermittelt. Das

ehemalige Ruhrbett bildet im Harkortsee mit merklich höheren Strömungsgeschwindigkeiten eine natürliche Barriere. Die Einleitung des geklärten Abwassers erfolgt auf der linken Seeseite im oberen Drittel, der Bootsanleger liegt auf der rechten Seite im unteren Drittel. Die höchsten Ammoniumgehalte wurden erwartungsgemäß um die Einleitung der Kläranlage gefunden.

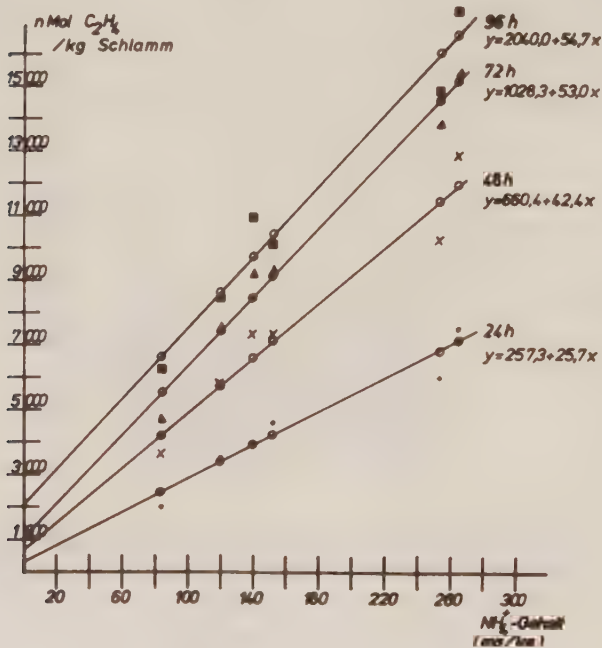


Abb. 7: Die Azetylenreduktionsrate in Abhängigkeit vom Ammoniumgehalt des Schlammes an verschiedenen Entnahmestellen im Harkortsee.
● 24 h, X 48 h, ▲ 72 h, ■ 96 h Inkubationszeit.
○ Errechnete Punkte der linearen Ausgleichsgeraden.

Bei den Azetylenreduktionsraten war eine direkte Korrelation mit dem natürlichen Ammoniumgehalt feststellbar. Je höher der Ammoniumgehalt, desto größer war die Menge des pro kg Schlamm gebildeten Äthylens (Abb. 6). In Abb. 7 sind die pro kg Schlamm gebildeten nMol C₂H₄

in Abhängigkeit vom NH_4^+ -Gehalt des Schlammes für den ersten bis vierten Inkubationstag aufgetragen. Da die Punkte zu den einzelnen Inkubationstagen sehr stark streuten, wurde eine lineare Ausgleichung nach der Formel $Y = a + bx$ vorgenommen. Dabei wurde zunächst willkürlich angenommen, daß eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Ammoniumgehalt des Schlammes und seiner Azetylenreduktionsrate bestehen soll. Die Berechnungen erfolgten nach der Methode der "kleinsten Fehlerquadrate" (KELLERER, 1960). Weiterhin wurde unterstellt, daß der Ammoniumgehalt des Schlammes genau bestimmt werden kann. Tatsächlich liegt aber im Verfahren der Kjeldahl-Destillation nach hier durchgeführten Serienuntersuchungen eine analytische Unsicherheit mit einer Standardabweichung von 9,5%. Diese wurde in der mathematischen Berechnung nicht berücksichtigt. Die errechneten Funktionen für die vier Inkubationstage sind aus Abb. 7 ersichtlich. Keine der Geraden geht durch den Nullpunkt des Koordinatensystems. Dies war zu erwarten, da auch ohne das Vorhandensein gebundenen Stickstoffs die biologische Stickstofffixierung durchgeführt wird.

Es war nun zu beweisen, daß die Annahme der linearen Abhängigkeit von Ammoniumgehalt und Azetylenreduktion gerechtfertigt war. Ein Maß für die Stärke und Richtung des Zusammenhanges von Meßwerten ist für den Fall der linearen Regreßion der "Bravais-Pearson'sche Korrelationskoeffizient r ".

Er kann nur Werte zwischen + 1 und - 1 annehmen. Je mehr sich r diesen Werten nähert, um so stärker ist der Zusammenhang. Die errechneten r -Werte sind aus Tab. 4 ersichtlich.

Da die ersten vier Meßwerte ziemlich dicht beisammen, die beiden letzten aber weiter entfernt liegen und auch eine größere Streuung aufweisen, wurde der Korrelationskoeffizient r für $n = 4$ und $n = 6$ Messungen getrennt berechnet, um mögliche Abweichungen festzustellen. Außer für den ersten Inkubationstag mit

Tab. 4: Berechnung der linearen Ausgleichsgeraden für die ersten vier Inkubationstage und der dazugehörigen "Bravais-Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r".

Stelle Nr.	Bezeichnung der Stelle	X - Werte NH_4^+ - Gehalt (mg/kg)	zugehörige Y - Werte nMol C_2H_4 /kg Schlamm				Berechnung der Korrelationskoeffizienten r für n = 4 Messungen und n = 6 Messungen			
			Inkubationszeit				Inkubationszeit			
			24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	D	84	2415	4223	5476	6633	$r_{n=4} = 0,991$	$r_{n=4} = 0,986$	$r_{n=4} = 0,989$	$r_{n=4} = 0,946$
2	C	120	3340	5749	7382	8602				
3	E	140	3854	6597	8441	9695	$r_{n=6} = 0,573$	$r_{n=6} = 0,969$	$r_{n=6} = 0,988$	$r_{n=6} = 0,979$
4	F	152	4163	7106	9077	10351				
5	B	254	6783	11432	14478	15929	$r_{n=6} = 0,573$	$r_{n=6} = 0,969$	$r_{n=6} = 0,988$	$r_{n=6} = 0,979$
6	A	265	7066	11898	15060	16530				

$r_{n=6} = 0,573$, liegen alle anderen Werte sehr dicht an + 1, d.h. es konnte mathematisch nachgewiesen werden, daß die Annahme der linearen Regreßion zwischen Ammoniumgehalt und Azetylenreduktion sehr gut abgesichert ist. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktion von höheren Ammoniumgehalten wird in Abschnitt 5. behandelt.

3.3. Chemisch-physikalische Eigenschaften des Schlammes an der Entnahmestelle F in den Jahren 1974 und 1975

Von Juni 1974 bis Mai 1975 wurde der Schlamm des Harkortsees monatlich einmal physikalisch und chemisch untersucht. Die Probenentnahmen erfolgten an Stelle F, von wo aus auch der Schlamm zu den verschiedenen Azetylenreduktionstests gezogen wurde. Die physikalischen und chemischen Untersuchungsergebnisse sind aus Tab. 5 ersichtlich.

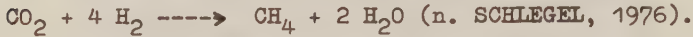
Der pH-Wert des Schlammes liegt im Neutralbereich zwischen pH 6,50 und 7,50, der Mittelwert liegt bei pH 6,80. Der Schlamm hat die typische dunkelgraue bis schwarze Färbung von Faulschlamm. Sein relativ hoher Anteil an organischer Substanz liegt im Jahres-

Tab. 5: Physikalische und chemische Untersuchung des Schlammes im Harkortsee von Juni 1974 bis Mai 1975.
Entnahmestelle: Bootssteg am Campingplatz.

Datum der Probenentnahme	10.6.	11.7.	5.8.	9.8.	7.10.	11.11.	9.12.	27.1.	27.2.	11.3.	15.4.	22.5.	Mittelwert	Standardabweichung s = z	s/s
	74	74	74	74	74	74	74	75	75	75	75	75			
Lufttemperatur	(°C)	14,1	17,6	14,2	16,4	9,7	8,3	9,1	6,4	16,1	8,0	9,0	—		
Wassertemperatur	(°C)	13,6	16,3	14,4	17,3	11,7	7,6	8,7	6,4	7,8	7,6	8,8	—		
Schlamm direkt															
Schlammtemperatur	(°C)	17,4	16,4	16,2	16,9	11,8	8,4	9,4	6,9	8,2	8,5	8,4	—	11,8	4,46
pH - Wert		6,95	7,30	7,20	7,00	6,92	6,90	6,73	6,51	6,54	6,57	6,77	6,60	6,82	0,26
Alkalinität	(g/l)	63,5	65,4	69,4	65,2	65,7	66,0	71,9	73,2	69,2	76,8	75,1	65,1	68,9	4,40
Trockengewicht	(g/l)	36,5	34,6	39,5	34,2	34,3	34,0	39,1	26,8	30,8	23,2	24,9	34,9	31,1	4,40
Cloridanteil	(g/l)	82,9	84,1	82,6	84,0	81,6	84,9	82,9	81,0	83,7	79,9	79,4	80,9	82,7	1,83
Cloridverlust	(g/l)	17,1	15,9	17,4	16,0	18,4	15,1	17,1	19,0	16,3	20,1	21,6	19,1	17,8	1,83
Ammoniak	NH_4^+ NH_3 (mg/kg)	280	192	177	175	187	140	179	228	203	223	234	471	219	80,80
		156	119	118	137	146	109	140	178	158	182	261	329	177	63,09
org. geb. N	(mg/kg)	1.794	1.519	1.620	1.365	1.427	1.282	1.516	1.587	1.620	1.543	1.753	2.941	1.580	294,38
= Esserlicher Auszug															
		Einzelprobe: 100 g Schlamm auf 1.000 ml dest.													
Ammoniak	NH_4^+ NH_3 (mg/l)	12,1	6,3	10,6	8,3	7,5	7,5	11,0	2,9	13,0	15,5	20,6	22,2	11,5	5,72
		9,4	4,9	8,3	6,5	5,9	5,9	8,6	2,3	10,1	12,1	16,1	17,3	9,0	4,46
org. geb. N	(mg/l)	2,3	3,7	2,2	3,7	1,6	1,6	2,1	2,0	2,7	4,1	2,6	—	2,7	0,84
Nitrit	NO_2^- NO_2 (mg/l)	0,02	0,03	0,03	0,02	0,010	0,04	Spuren	Spuren	0,07	0,047	Spuren	Spuren	—	—
		0,006	0,009	0,009	0,004	0,005	0,012			0,02	0,014				
Nitrat	NO_3^- NO_3 (mg/l)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren		
Gesamt - N	(mg/l)	11,7	8,6	10,5	10,2	7,5	7,5	10,7	4,3	13,8	16,2	19,7	17,9		
Salinität	SO_4^{2-} SO_4 (n.n.)	n.n.	n.n.	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	20	14	Spuren	Spuren		
Druckverfestigkeit	($\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{g Fe}_2\text{O}_3$)	29	26	32	57	32	66	55	32	57	57	65	43	46	15,05
elektr. Leitfähigkeit	(mS/cm)	180	—	158	135	123	180	210	132	228	198	230	205	180	39,36
pH - Wert		7,90	7,90	7,20	7,80	7,43	7,60	7,23	7,35	7,62	7,50	7,68	7,74		
Gesamt - Eisen	(mg/l)	0,25	0,18	0,40	0,13	0,10	0,33	0,16	2,44	3,41	3,11	3,07	3,51		
Kupfer	(mg/l)	0,116	0,026	0,012	0,042	0,128	0,021	0,018	0,018	0,017	0,012	0,047	0,053		
Mangan	(mg/l)	0,031	0,010	n.n.	0,040	n.n.	Spuren	n.n.	0,060	0,230	0,010	n.n.	n.n.		
Gesamt - Chlor	(mg/l)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.		

mittel bei rund 18%, hier bestimmt als Glühverlust. Dies dürfte zu einem nicht unerheblichen Teil auf die Einleitung der vollbiologisch geklärten Abwässer aus der Kläranlage Hagen in den See zurückzuführen sein. Bei der gaschromatographischen Untersuchung der Schlammproben war in den Inkubationsflaschen stets Methangas nachweisbar, was die Anwesenheit der obligat anaeroben Methanbakterien beweist. Hierher gehören Organismen der Gattungen METHANOBACTERIUM, METHANOSARCINA und METHANOCOCCUS. Sie setzen Alkohole und organische Säuren zu Methan und Kohlendioxid um. Methan kann auch durch vollständige Reduktion von Kohlendioxid gebildet werden, wobei in den meisten

Fällen molekularer Wasserstoff als H-Quelle dient:



Der hohe Anteil Ammonium, das nur in Spuren nachzuweisende Nitrit und das Fehlen von Nitrat lassen zwei Schlüsse zu. Die Oxidation von Ammonium zu Nitrat, die summarisch als "Nitrifikation" bezeichnet wurde, kann im vorliegenden Biotop bestenfalls an der aeroben Schlammoberfläche ablaufen, d.h. sie nimmt - bezogen auf das gesamte Biotop Schlammkörper - nur einen kleinen Raum ein. Da der Schlamm ein vorwiegend anaerobes Milieu darstellt, gibt es zwei Möglichkeiten, wie das Nitrat-Ion weiter genutzt werden kann. Einmal sind durch Denitrifikation gasförmige Verluste als N_2 und N_2O möglich (vergl. Abschnitt 1.2.). Daß im Harkortsee eine nennenswerte Denitrifikation stattfindet, wird im Abschnitt 9.4. gezeigt. Andererseits kann das Nitrat aber auch durch fakultative und obligate Anaerobier wieder zum Ammonium reduziert werden, ein zur Nitrifikation invers verlaufender Vorgang. Dieser Weg wurde in Abb. 1 als "assimilatorische Nitratreduktion" bezeichnet. Das Fehlen von Nitrat und die nur spurenhafte Anwesenheit von Nitrit werden somit verständlich.

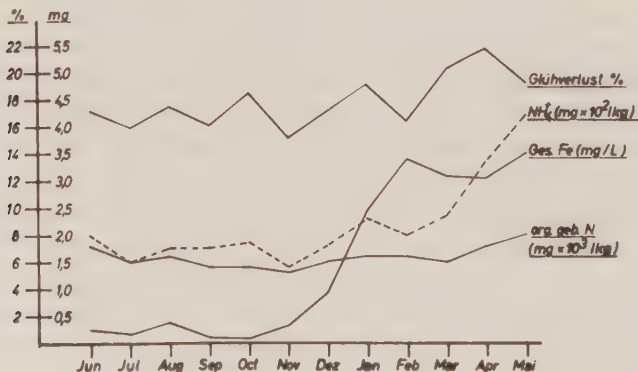


Abb. 8: Die Abhängigkeit der organischen Schlammbelastung von der Jahreszeit.

Die hohen Werte für Oxidierbarkeit und Phosphat zeigen ebenfalls die starke organische Belastung des Schlammes an. Die Tab. 5 und Abb. 8 zeigen darüberhinaus, daß bei einem Ansteigen der "organischen" Parameter im Schlamm (Ammonium- und Phosphatgehalt, organisch gebundener Stickstoff, Glühverlust) die "anorganischen" Parameter, hier der Eisengehalt, ebenfalls ansteigen. Dieser Anstieg ist ab November 1974 bis in das Frühjahr 1975 festzustellen. Der Anstieg der "organischen" Parameter ist auf die bakterielle Zersetzung des mit dem Ruhrwasser im Herbst in den See eingeschwemmten und hier sedimentierenden organischen Materials, insbesondere Laubwerk, zurückzuführen. Mit fortschreitender Zersetzung werden die nicht weiter abbaubaren anorganischen Stoffe nach und nach freigesetzt. Das gleichzeitige Ansteigen des organisch gebundenen Stickstoffs zeigt die Zunahme der Bakterienmasse. Das starke Ansteigen des Ammoniumgehaltes in den Wintermonaten kann wohl nur zum Teil auf Nitratammonifikation zurückgeführt werden. Auffällig ist die Übereinstimmung im Anstieg des Ammoniumgehaltes ab November mit einer Vervierfachung der aeroben Stickstofffixierung. Möglicherweise ist die Zunahme des Ammoniumgehaltes somit auch auf verstärkte bakterielle Fixierungstätigkeit zurückzuführen. Auf den Jahresgang der aeroben und anaeroben Stickstofffixierung wird in Abschnitt 7. näher eingegangen. Das Absinken der "organischen" Parameter (Glühverlust, Gesamt-N, Phosphat) im April 1975 zeigt die Verlangsamung der bakteriellen Zersetzung an, weil die Rohmaterialien weitgehend abgebaut sein dürften (Tab. 5). Toxische Metallkonzentrationen wurden nicht festgestellt. Schwermetalle fehlen völlig oder liegen unter der sicheren Nachweisgrenze von 0,001 mg/l wässrigem Auszug und sind damit biologisch-toxikologisch bedeutungslos.

3.4. Der Zusammenhang von Ammoniumgehalt und organisch gebundenem Stickstoff im Schlamm des Harkortsees

Nach dem festgestellten positiv linearen Zusammenhang von natürlichem Ammoniumgehalt des Schlammes und seiner anaeroben Azetylenreduktion, besteht ein weiterer Zusammenhang zwischen dem Ammoniumgehalt und dem organisch gebundenen Stickstoff. Die Probenentnahmestellen A und B haben den höchsten Ammoniumgehalt (260 mg/kg im Mittelwert) und gleichzeitig den höchsten Gehalt an organisch gebundenem Stickstoff (im Mittel 1808 mg/kg). Die Entnahmestellen C und D zeigten im Juli 1974 den niedrigsten Ammoniumgehalt (102 mg/kg) und gleichzeitig auch den niedrigsten Wert für organisch gebundenen Stickstoff (im Mittel 1302 mg/kg; Tab. 3). Die Ergebnisse der monatlichen Schlammuntersuchungen von Juni 1974 bis Mai 1975 sind aus Tab. 5 ersichtlich. Hier zeigt sich ebenfalls, daß mit steigendem Ammoniumgehalt auch der Gehalt an organisch gebundenem Stickstoff zunimmt.

Tab. 6: Untersuchungen zum Verhältnis von organisch gebundenem Stickstoff zum Ammoniumgehalt im Schlamm des Harkortsees.

Datum d. Probenentnahme	$p = \frac{\text{org. geb. N}}{\text{Ammoniumgeh.}}$	Diff. X v. MW	X ²	Diff. X v. MW	X ²
10. 6. 74	8,97	+ 1,25	1,56	+ 0,89	0,79
11. 7. 74	9,93	+ 2,21	4,88	"Ausreißer"	
5. 8. 74	9,13	+ 1,43	2,04	+ 1,07	1,14
9. 9. 74	7,80	+ 0,08	0,01	- 0,28	0,08
7.10. 74	7,63	- 0,09	0,01	- 0,43	0,20
11.11. 74	9,15	+ 1,43	2,04	+ 1,07	1,14
9.12. 74	8,46	+ 0,74	0,55	+ 0,38	0,14
27. 1. 75	6,96	- 0,76	0,58	- 1,12	1,25
27. 2. 75	7,98	+ 0,26	0,07	- 0,10	0,01
11. 3. 75	6,68	- 1,10	1,21	- 1,46	2,13
19. 4. 75	5,24	- 2,48	6,15	"Ausreißer"	
23. 5. 75	4,84	- 2,88	8,29	"Ausreißer"	
MW:	7,72		27,39	MW:	8,08
					6,88
			2,49		1 m-1 (8)=0,86
	$s = \pm \sqrt{2,49}$				$s = \pm \sqrt{0,86}$
	$s = \pm 1,575$				$s = \pm 0,928$
	$s = \pm 20,4 \%$				$s = \pm 11,5 \%$

Das Verhältnis von organisch gebundenem Stickstoff : Ammoniumgehalt wurde berechnet und als Faktor F angegeben. Falls eine direkte Abhängigkeit zwischen diesen beiden Parametern besteht, müßte ein annähernd konstanter Faktor herauskommen. Von dem Faktor F wurde die Standardabweichung S und % S errechnet (Tab. 6).

Berücksichtigt man alle Werte, so errechnet sich die Standardabweichung mit rund 20%. Läßt man die als offensichtliche "Ausreißer" gekennzeichneten drei Proben außer acht, so ergibt sich bei einer erneuten Berechnung nur noch eine Standardabweichung von 11,5%. Die Standardabweichung für die Ammonium-Kjeldahl-Destillation war mit 9,5% bestimmt worden (Abschnitt 3.2.). Dieser Wert deckt sich ziemlich gut mit dem hier ermittelten von 11,5%, da ja beide Bestimmungen im Prinzip nach demselben Verfahren durchgeführt werden.

Es kann also festgehalten werden, daß neben der linearen Abhängigkeit von Ammoniumgehalt und anaerober Azetylenreduktion auch eine positiv lineare Beziehung zwischen dem Ammoniumgehalt und dem organisch gebundenen Stickstoff im Schlamm des Harkortsees besteht.

3.5. Die biologische Besiedlung des Harkortsees an der Entnahmestelle F von Juli 1974 bis Oktober 1975

In dem obengenannten Zeitraum wurden am Harkortsee in etwa monatlichen Abständen biologisch-ökologische Gewässergüteuntersuchungen durchgeführt. Die Probenentnahmen erfolgten vom "Bootssteg am Campingplatz" (Stelle F).

Zunächst sollen die Begriffe "Trophiegrad", "Saprobietätsgrad" und "Gewässergüte" kurz definiert werden. Oligotroph sind Gewässer mit geringem Nährstoffangebot und geringer organischer Produktion. Die essentiellen Nährstoffe, wie Stickstoff- und Phosphorverbindungen, liegen in geringer Konzentration als

wachstumsbegrenzende Faktoren vor. Die Sauerstoffsättigung ist gut, Faulschlamm fehlt. Hier decken sich die Begriffe "oligotroph" des Limnologen und "oligosaprob" (s.u.) des Abwasserbiologen. Das Gegenstück dazu ist der eutrophe Seentyp. Dies sind Gewässer mit guter bzw. überreichlicher Nährstoffzufuhr und reicher biologischer Produktion. Häufig kommt es infolge Massenentwicklung einzelner Arten zu Wasserblüten. Die sonst wachstumsbegrenzenden Stickstoff- und Phosphorverbindungen sind in ausreichender Menge vorhanden. Als Übergangsstufe zwischen oligo- und eutroph gilt der mesotrophe See. Er ist sinngemäß charakterisiert. Der polytrophe See geht über den eutrophen in seinem Nährstoffangebot hinaus. Alle essentiellen Nährstoffe sind stets in ausreichender Menge vorhanden. Er ist tagsüber infolge biogener Belüftungsrate nahezu voll sauerstoffgesättigt, nachts ist durch hohe Zehrungs- und Atmungsraten ein starker Abfall der Sauerstoffgehalte zu beobachten. Die erweiterten Begriffe "eutroph" der Limnologie decken sich nicht mit irgendeiner Saprobienstufe der Abwasserbiologie. Hier ist zur Beurteilung des Verschmutzungsgrades eines Gewässers wichtig, vom beginnenden Abbau der organischen Substanz an mehrere Zonen zu unterscheiden. Als Einteilungsprinzip dienen, von der Fäulnis ausgehend, die Hauptabbaustufen im Selbstreinigungsvorgang, wobei der Mineralisationsverlauf des Eiweißes im Vordergrund steht. Mit der chemischen Dreiteilung geht im biologischen Sinne ebenfalls eine Dreiteilung einher:

- | | |
|---|--|
| 1.) Reduktionszone: | entspr. "Polysaprobie" |
| 2.) Überwindung der Reduktion und Einsetzen der Oxidation | entspr. "Mesosaprobie" $\begin{matrix} \nearrow \alpha \\ \searrow \beta \end{matrix}$ |
| 3.) Vollendung der Oxidation und Mineralisation | entspr. "Oligosaprobie" |

Der weite Bereich der mesosaproben Stufe wird in einen α - und β -Abschnitt unterteilt, von denen der α -Abschnitt chemisch durch das Vorherrschen von

Aminosäuren, der B-Bereich durch das Vorhandensein von Ammoniak und organischen Säuren gekennzeichnet ist. Das biologische Saprobiensystem beruht darauf, daß gewisse Pflanzen und Tiere Fäulnisbewohner ("Saprobien") sind. Die Gliederung der Organismen in Rein- und Schmutzwasseranzeiger erfolgte auf der Grundlage des von KOLKWITZ & MARSSON, (1902) geschaffenen Saprobiensystems. Dieses wurde u.a. von BEGER, (1966); LIEBMANN, (1951 und 1960); MAUCH, (1976); NYGAARD, (1949); PANTLE & BUCK, (1955); SLADECEK, (1973); STREBLE & KRAUTER, (1973) revidiert und ergänzt. Zu jeder Saprobienstufe gibt es hochspezialisierte Leitorganismen. Bei manchen Formen bestehen zwischen den einzelnen Saprobienstufen mehr oder weniger fließende Übergänge, nur in geringem Maße kommen auch unempfindliche Ubiquisten vor. Für den Laien wurden neben die Saprobienstufen sogenannte "Gewässergüteklassen" gestellt, die auf Gütekarten eine farbliche Darstellung der Oberflächengewässer erlauben. Eine Zusammenstellung zeigt Tab. 7.

Tab. 7: Die Einteilung des Saprobiensystems und die daraus resultierenden Gewässergüteklassen, ohne Berücksichtigung der Zwischenstufen (verändert nach "DEV" M 6).

Gewässer- qualität	Saprobien- stufe	Abkür- zung	Gew.- Güte	farbl. Darstellg.	Saprobien- index
nicht ver- unreinigt	oligosaprob	os	I	blau	1,0 - 1,8
mäßig ver- unreinigt	β-mesosaprob	Bms	II	grün	1,8 - 2,7
stark ver- unreinigt	α-mesosaprob	ams	III	gelb	2,7 - 3,5
übermäßig stark ver- unreinigt	polysaprob	ps	IV	rot	3,5 - 4,0

Eine Übersicht über die biologische Besiedlung des Harkortsees im Jahresverlauf geben die Tab. 8 und Abb. 9. Der See zeigte an der Entnahmestelle F im Mittel eine Wassertiefe zwischen 75 und 85 cm. Die typische horizontale thermische Schichtung, wie sie von tieferen Seen und Talsperren bekannt ist, tritt im Harkortsee

nicht auf, weil er zu flach ist. Außerdem besorgen Wasserbewegungen, hervorgerufen durch Strömung und Wind, eine gleichmäßige Durchmischung des Wasserkörpers. Damit werden die Nährstoffe gleichmäßig im See verteilt und es ist keine Schichtung der planktischen Organismen festzustellen. Im Sommer treten häufig Algenblüten bzw. Vegetationstrübungen auf. Sie werden hier weniger durch Blaualgen hervorgerufen, wie es aufgrund des Seentypes zu erwarten gewesen wäre, als vielmehr durch das ganze Jahr über vorhandene Kiesel- und Grünalgen der Gattungen *ASTERIONELLA*, *MELOSIRA*, *STEPHANODISCUS*, *SCENEDESMUS*, *PEDIASTRUM*, *CLOSTERIUM* und coccale Grünalgen vom *CHLORELLA*-Typ. Die hier auswahlweise aufgeführten Gattungen sind im Harkortsee regelmäßig und meistens in großer Individuenzahl anzutreffen, so daß auch aufgrund der biologischen Besiedlung die Eingruppierung in den eutrophen Seentyp gerechtfertigt ist. Der Saprobienindex und die biologisch wirksame organische Belastung zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Jahreszeit (Tab. 8). In den Sommermonaten findet wegen der hohen Planktondichte ein guter Abbau der Verschmutzung im See statt. Das Artenspektrum ist reich, es überwiegen die β ms photoautotrophen Kiesel- und Grünalgen. Der Quotient der biologisch wirksamen Belastung liegt im Mittel zwischen 30 - 40%, d.h. $\frac{1}{3}$ der aufgefundenen Arten sind Leitorganismen für stark und übermäßig stark verschmutztes Wasser. Anders sieht es im Herbst, Winter und zeitigen Frühjahr aus. Erstens nimmt die Artenzahl ab, aber auch die Individuendichte geht stark zurück (Abb. 9). Mit der Abnahme der photoautotrophen Algen im Herbst und Winter geht eine Vermehrung der α -mesosaproben bis polysaproben heterotrophen Bakterien, Flagellaten und Ciliaten einher, die offensichtlich durch das Phytoplankton im Sommer in ihrer Entfaltung gehemmt werden. Im Dezember 1974 und Januar 1975 lag die biologisch wirksame Belastung etwa doppelt so hoch wie in den Sommermonaten. Diese Umschichtungen und Veränderungen in der Besiedlung und

Besiedlungsdichte finden ihren Niederschlag auch im Saprobienindex und der daraus resultierenden Gewässergüteklasse. In den Sommermonaten schwankt die Gewässergüte im See an der Grenze zwischen II und II - III ($S = 2,2 - 2,5$), d.h. er ist kritisch belastet. Im Herbst und Winter geht mit Abnahme der Individuendichte und -zahl auch eine Verschlechterung der Wasserqualität in die Gütestufe III ($S = 2,8 - 3,1$) einher, der See ist als stark verschmutzt zu bezeichnen. Mit ansteigender Individuendichte und Artenzahl im Frühjahr wird die Wasserqualität wieder besser. Das auffallend gute Ergebnis im März 1975 geht auf milde Witterung, geringe Niederschläge und gute Sonneneinstrahlung zurück. Das typische "Aprilwetter" mit Schnee- und Graupelschauern brachte eine erneute Verschlechterung. Die a-mesosaprobe Artenzahl und -dichte blieb im Untersuchungszeitraum relativ konstant, was wiederum die ständige organische Belastung des Sees anzeigt (Abb. 9).

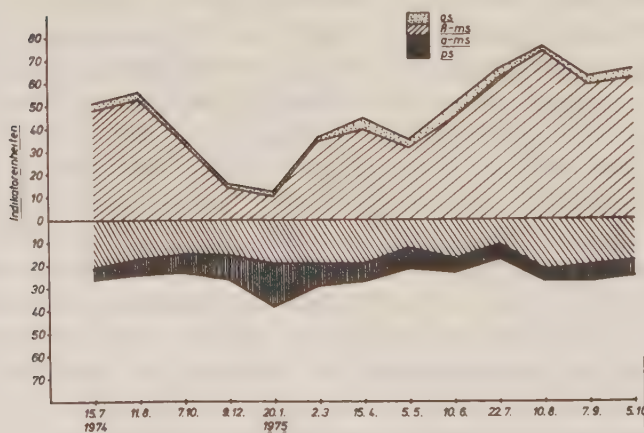


Abb. 9: Biologisch-ökologischer Gütezustand des Harthortsees von Juli 1974 bis Oktober 1975.

Das hier zur Anreicherung der Organismen benutzte Planktonnetz hatte eine Maschenweite von 28μ . Diese Maschenweite hatte aber zur Folge, daß das Nannoplankton im weiteren Sinne, das sich aus dem Ultrannoplankton mit Größen unter 2μ und dem Nannoplankton sensu strictu mit Größen von $2 - 20 \mu$ zusammensetzt, nicht erfaßt wurde. Angereichert und bestimmt wurde nur das

Mikroplankton	$20 - 200 \mu$,
Mesoplankton	$200 - 2000 \mu$ und
Megaplankton	über 2000μ .

Diese drei Planktongrößen werden auch als das eigentliche "Netzplankton" ("net plankton") zusammengefaßt (SCHWOERBEL, 1966). Das Nannoplankton mit seinen winzigen Formen ist aufgrund fehlender morphologischer Differenzierungsmerkmale nur sehr schwer exakt zu bestimmen, so daß sich unter diesen Formen keine Leitorganismen für Gewässergüteuntersuchungen befinden. Die artenreichen winzigen farblosen Flagellaten, die teilweise nur durch bestimmte physiologische Leistungen zu determinieren sind, wurden summarisch als "kleine heterotrophe Flagellaten" zusammengefaßt. Die echten Leitorganismen finden sich bei den autotrophen Organismen hauptsächlich unter den Kiesel-, Grün- und Blaualgen. Bei den heterotrophen Organismen kommt den Ciliaten in ihrer ganzen Entwicklungsvielfalt eine besondere Bedeutung zu, gefolgt von den höheren Metazoen. Alle diese Organismen fallen unter das "Netzplankton" und wurden somit angereichert.

Zum Schluß sollen noch einige charakteristische Leitorganismen des Harkortsees vorgestellt werden.

Alle Aufnahmen wurden ausgeführt mit:

Mikroskop: Umgekehrtes Mikroskop ZEISS UPL;

Kamera: ZEISS CONTAFLEX SUPER BC;

Film: AGFA IFF ISOPAN 15 DIN.

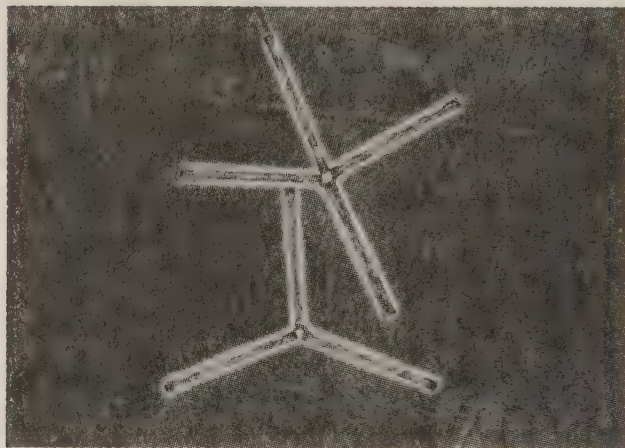


Abb. 10: Netzplankton des Harkortsees.
ASTERIONELLA FORMOSA (Lebendmaterial).
Entnommen am 4.1.1977;
Mikroskopvergrößerung: 390 fach;
Phasenkontrast; Belichtungszeit: 1/4 sec.

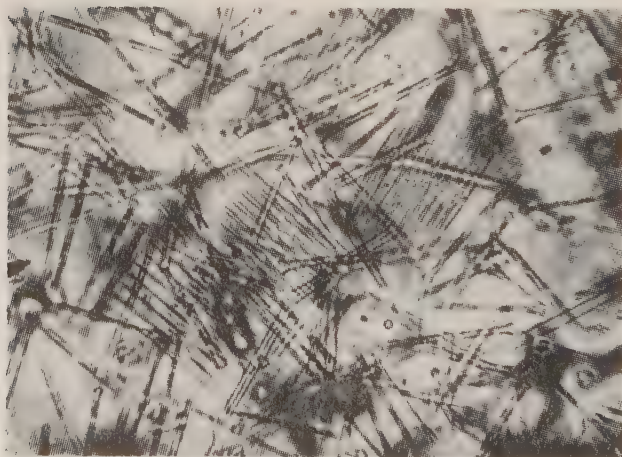


Abb. 11: Netzplankton des Harkortsees.
Massenentwicklung von ASTERIONELLA FORMOSA,
dazwischen zwei Platten FRAGILARIA CROTONENSIS
(Lebendmaterial). Entnommen am 30.4.1976;
Mikroskopvergrößerung: 300 fach;
Belichtungszeit: 4 sec.

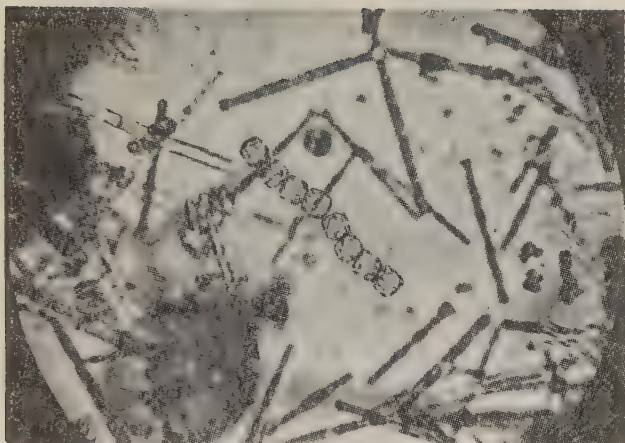


Abb. 12: Netzplankton des Harkortsees.
Eine Kette von STEPHANODISCUS HANTZSCHII
(Lebendmaterial).
Entnommen am 30.4.1976;
Mikroskopvergrößerung: 400 fach;
Belichtungszeit: 2 sec.

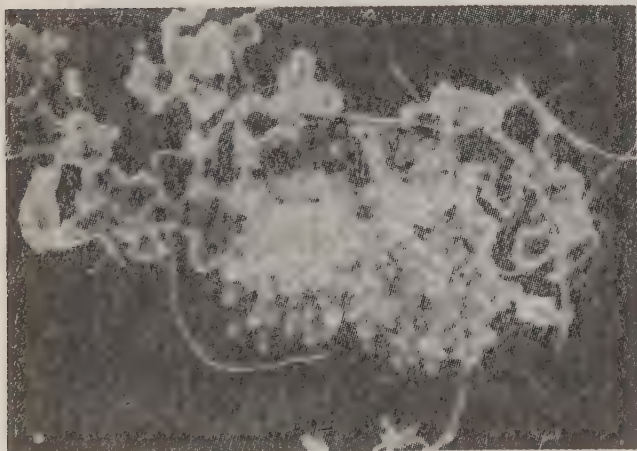


Abb. 13: Netzplankton des Harkortsees.
ZOOGLOEA RAMIGERA (Lebendmaterial).
Entnommen am 4.1.1977;
Mikroskopvergrößerung: 160 fach;
Phasenkontrast; Belichtungszeit: 1/8 sec.

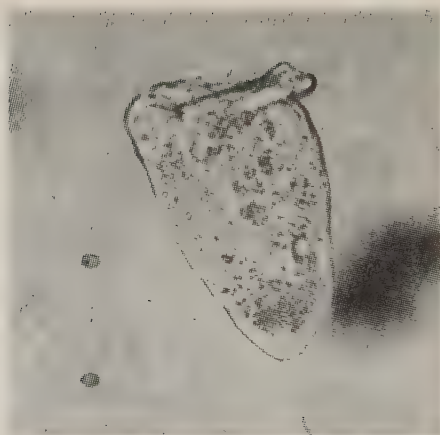


Abb. 14: Netzplankton des Harkortsees.
VORTICELLA CONVALLARIA (Lebendmaterial).
Entnommen am 4.1.1977;
Mikroskopvergrößerung: 390 fach;
Belichtungszeit: 1/8 sec.



Abb. 15: Netzplankton des Harkortsees.
Massenentwicklung von SYNEDRA ULNA
(Lebendmaterial).
Entnommen am 4.1.1977;
Mikroskopvergrößerung: 160 fach;
Phasenkontrast; Belichtungszeit: 1/15 sec.

4. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von der Inkubationstemperatur

Vorweg sei festgestellt, daß eine nicht-biologische Produktion von Äthylen, wie sie von THAKE & RAWLE, (1972) beschrieben wurde, bei den Proben ohne Azetylenzugaben niemals beobachtet wurde. Auch bei den tiefgeköhlten Proben war keinerlei Azetylenreduktion feststellbar. Zusammenstellungen der Untersuchungsergebnisse zeigen Tab. 9, sowie die Abb. 16 und 17.

Bei 0 °C war eine ziemlich gleichbleibende Reduktionsrate im Mittel von $34,5 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ zu beobachten. Die Reduktionsraten stiegen über 20 °C bis 25 °C stark an. Bei 30 °C lagen sie in den ersten 24 h noch etwa $10 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ höher als bei 25 °C, sie verlangsamten sich dann aber, so daß nach dem zweiten Versuchstag die Azetylenreduktionsraten der 25 °C Proben um rund $10 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ höher lagen, als die der 30 °C Proben. Der Schnittpunkt der beiden Kurven, in dem gleiche Mengen Äthylen gebildet wurden, lag bei 36 h Inkubationszeit. Die Reduktionsraten der 30 °C Proben fielen während der folgenden Tage weiter ab. Das Temperaturoptimum der bakteriellen Stickstofffixierung muß demnach zwischen 25 °C und 30 °C liegen. Bei 40 °C traten während der ersten 24 h auch relativ hohe Reduktionsraten von $125,2 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ auf, diese sanken nach dem ersten Inkubationstag jedoch auf $1/3$ des Ausgangswertes ab, waren dann aber ziemlich gleichbleibend. Bei dieser Bebrütungstemperatur war bereits eine merkliche Beeinträchtigung der bakteriellen Fixierungstätigkeit festzustellen. Die biologischen Reduktionsraten bei 50 °C und 60 °C lagen niedriger als bei 0 °C. Sie haben unter natürlich ökologischen Gesichtspunkten sicher keine Bedeutung, da diese Temperaturen, außer in Thermalquellen, nicht erreicht werden (siehe FOGG, 1974). Immerhin ist erstaunlich, daß bei 60 °C überhaupt noch eine biologische Reduktion des Azetylen stattfindet. Bei 70 °C war sie nur noch innerhalb der ersten 24 h nachweisbar. Sie könnte auf besonders

Tab. 9: Die Abhängigkeit der biologischen Azetylenreduktionsrate von der Inkubationstemperatur. (Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse).

Inkub.- Zeit	24 h		48 h		72 h		96 h	
Inkub.- Temp. (°C)	Red.- Rate $\text{zh}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{zh}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{zh}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{zh}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg
- 24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
± 0	40,7	977	33,8	1789	28,2	2465	35,3	3313
+ 20	155,1	3721	90,6	5895	85,5	7945	51,8	9174
+ 25	182,3	4375	103,2	6852	95,1	9135	59,0	10552
+ 30	191,6	4598	90,6	6772	78,6	8657	44,5	9726
+ 40	125,2	3006	47,7	4151	46,1	5258	30,0	6169
+ 50	30,4	730	13,1	1044	27,6	1706	16,0	2570
+ 60	28,8	691	9,3	914	25,8	1533	16,5	1929
+ 70	12,6	302	0,00		0,00		0,00	

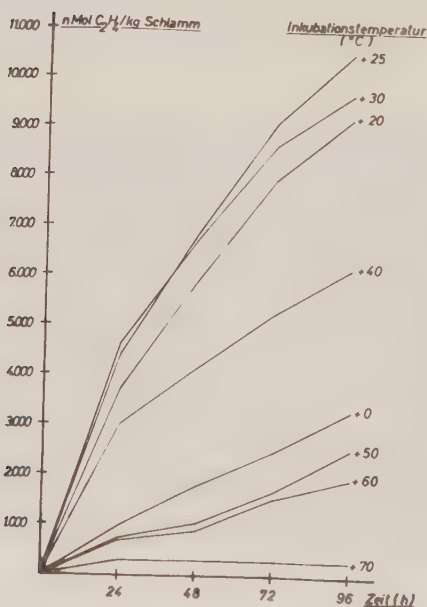


Abb. 16: Die Abhängigkeit der biologischen Azetylenreduktionsrate von der Inkubationstemperatur.

wärmeresistente Bakterien während der ersten Inkubationsstunden zurückzuführen sein, die dann allerdings auch abstarben.

Trägt man die Anzahl der gebildeten nMol C_2H_4 /kg Schlamm der ersten 24 h für die genannten Temperaturstufen auf, ergibt sich die in Abb. 17 dargestellte Kurve.

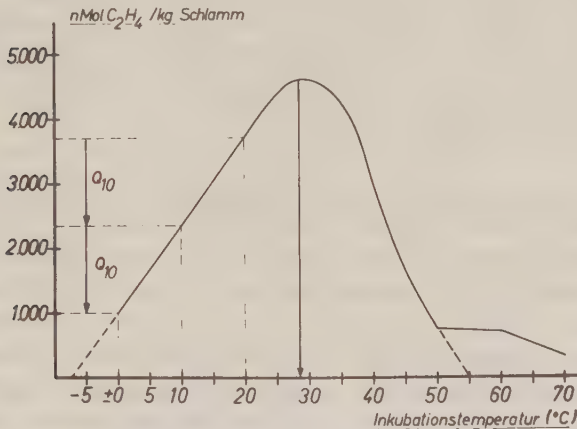


Abb. 17: Die Abhängigkeit der biologischen Azetylenreduktion von der Inkubationstemperatur während der ersten 24 h Inkubationszeit.

Es handelt sich um eine Parabel, die in ihrem aufsteigenden Ast zwischen 0 °C und 25 °C eine direkte lineare Abhängigkeit der Azetylenreduktion von der Inkubationstemperatur zeigt. Fällt man vom Scheitelpunkt der Parabel das Lot auf die Abszisse zeigt sich, daß das Temperaturoptimum und damit das Maximum der bakteriellen Azetylenreduktion bei + 28 °C liegt. Der absteigende Ast der Parabel verläuft steiler als der aufsteigende. Verlängert man die beiden Äste geradlinig weiter bis zur Abszisse, so liegt der "Kälteschlaf" der Azetylenreduktion im vorliegenden natürlichen Schlammssediment bei - 7,5 °C, der "Hitzetod" tritt demnach bei etwa + 55 °C ein. Daß über 55 °C hinaus zunächst noch eine geringfügige biologische Azetylenreduktion auftrat, wurde bereits erwähnt.

Daß die Tiefkühlung der Bakterien nur vorübergehend ihre Lebensaktivitäten hemmt, wurde experimentell nachgewiesen. Die für 62 h tiefgekühlten Schlammproben wurden nach dieser Zeit bei 30 °C weiterinkubiert und in verschiedenen Zeitabständen gaschromatographisch untersucht. Dabei ergab sich in den ersten 10 h nach Auftauen eine Reduktionsrate von $67 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$, die nach weiteren 120 h auf im Mittel $30,6 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ abfiel. Der Mittelwert lag bei $48,8 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ und war damit etwa gleichhoch wie die normalen 30 °C Proben nach 96 h Inkubationszeit.

4.1. Die experimentelle Bestätigung der "Q₁₀-Regel"

Eine Bestätigung der "Q₁₀-Regel" findet man im aufsteigenden Ast der Parabel in Abb. 17. Fällt man für beliebige Temperaturpunkte (hier 0 °C, 10 °C und 20 °C) das Lot auf die Kurve und verbindet den Schnittpunkt mit der auf der Ordinate dargestellten Anzahl nMol C₂H₄, kann man die Steigerung der Reduktionsraten für 10° Temperaturerhöhung direkt ablesen. Während in den ersten 24 h bei 0 °C rund 1000 nMol C₂H₄ gebildet wurden, waren es bei 10 °C schon 2350 nMol. Bei diesem Temperatursprung lag die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mehr als doppelt so hoch. Der Faktor ist 2,35. Nimmt man die nächste Temperaturstufe von 10 °C nach 20 °C, so lag die Anzahl der gebildeten nMol C₂H₄ bei 2350 resp. 3700. Hier beträgt der Faktor nur 1,57. Mit steigender Temperatur und Annäherung an das Temperaturoptimum fällt die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit für 10° Temperaturerhöhung unter den Faktor 2 ab, während im unteren Temperaturbereich Faktoren über 2 erreicht werden.

4.2. Die Bestimmung der chemischen Azetylenreduktionsraten sterilisierter und veraschter Schlammproben

Neben der biologischen wurde auch die chemische Reduktion des Azetylens zum Äthylen beobachtet. Untersuchte man die Reduktionsraten der im Autoklaven sterilisierten Blindproben bei den vorgenannten Inkubationstemperaturen, war ganz allgemein ein Anstieg der chemischen Azetylenreduktion mit der Inkubationstemperatur festzustellen (Tab. 10, Abb. 18).

Bei -24°C und 0°C trat sie nicht auf. Zwischen 20°C und 30°C war sie unbedeutend, bei 40°C lag sie während der ersten 24 h bei rund $10 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$, sank im weiteren Verlauf aber ab und erreichte die Werte, wie sie bei Bebrütungstemperaturen zwischen 20°C und 30°C beobachtet wurden. Bei 50°C betrug sie das $1\frac{1}{2}$ fache derjenigen bei 40°C . Bei 60°C waren chemische und biologische Reduktion des Azetylens etwa gleichgroß. Dies kam nicht so sehr in den Reduktionsraten, als vielmehr in der Anzahl der gebildeten $\text{nMol C}_2\text{H}_4/\text{kg Schlamm}$ zum Ausdruck. Die chemische Azetylenreduktion bei 70°C war höher als die biologische bei 0°C . Es bleibt festzuhalten, daß im physiologischen Temperaturbereich bis 30°C nur eine geringfügige chemische Reduktion des Azetylens zum Äthylen stattfand. Sie betrug bei der für die Tests gewählten Bebrütungstemperatur von 25°C nur 3,6 % der biologischen Reduktion. Von den Meßwerten der biologisch aktiven Proben wurde die Menge des durch chemische Reduktion gebildeten Äthylens subtrahiert.

In diesem Zusammenhang wurde auch die Frage untersucht, wie die chemische Reduktion des Azetylens unterdrückt werden kann und ob sie bei ausgeglühten Schlammproben auch noch auftritt. Die Vorbehandlung der Proben ist aus Tab. 11 ersichtlich. Zu jeder Ascheprobe, deren Gewicht 2,5 - 3,0 g betrug, wurden 4 ml steriles A. dest. zugegeben, um eine wässrige Suspension zu erhalten. Die Probe 1 (Tab. 11) zeigte Reduktionsraten in der bereits beschriebenen Größenordnung.

Tab. 10: Die Abhängigkeit der chemischen Azetylen-reduktionsrate steriler Schlammproben von der Inkubationstemperatur.
(Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse).

Inkub.- Zeit	24 h		48 h		72 h		96 h	
Inkub.- Temp. (°C)	Red.- Rate C_2H_2 $\text{xh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_2 /kg	Red.- Rate C_2H_2 $\text{xh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_2 /kg	Red.- Rate C_2H_2 $\text{xh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_2 /kg	Red.- Rate C_2H_2 $\text{xh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_2 /kg
- 24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
± 0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
+ 20	7,0	168	3,5	232	3,5	336	0,00	336
+ 25	7,0	168	3,5	232	3,5	336	3,5	420
+ 30	8,7	209	7,0	377	7,0	545	3,5	629
+ 40	10,3	247	8,7	456	7,0	624	3,5	707
+ 50	9,0	216	17,6	638	8,0	830	7,3	1005
+ 60	15,4	370	25,7	987	18,7	1436	23,6	2002
+ 70	49,8	1195	49,8	2390	37,7	3295	8,6	3501

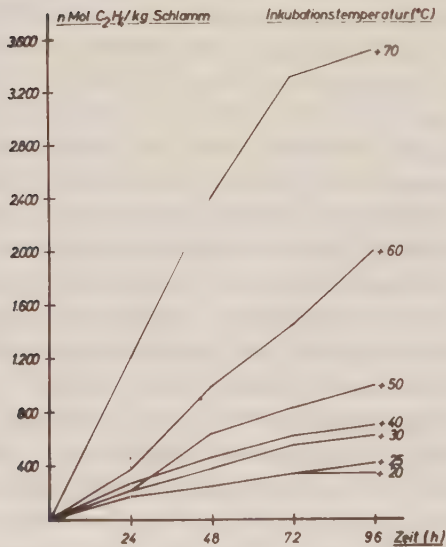


Abb. 18: Die Abhängigkeit der chemischen Azetylen-reduktionsrate steriler Schlammproben von der Inkubationstemperatur.

Tab. 11: Untersuchung der Azetylenreduktionsraten sterilisierter und ausgeglühter Schlammproben mit Chemikalienzusätzen.

Inkub.- Zeit		24 h		48 h		72 h		96 h	
Nr.	Inkub.- Temp. (°C)	Red.- Rate $\text{xh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{xh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{xh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{xh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg
1	+ 60	12,3	295	20,3	782	13,0	1094	15,6	1468
2	+ 60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	+ 60	99,1	2378	68,5	4022	72,5	5762	71,1	7468
4	+ 60	20,7	497	0,00		0,00		0,00	
5	+ 60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	+ 60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Behandlung der Proben:

- 1 - 3: im Autoklaven sterilisierte Schlämme (124 °C, 20 min)
 - 1: ohne Chemikalienzusatz;
 - 2: + 2 ml 50 %ige Trichloressigsäure;
 - 3: + 2 ml konz. NaOH;
- 4 - 6: Schlamm 24 h bei 110 °C getrocknet, zermörsert, anschl. 4 h bei 800 °C verglüht
 - 4: nur Asche;
 - 5: nach Verglühen 26,6 bzw. 6,2 mg Ammoniummolybdat zugegeben;
 - 6: Schlamm getrocknet, dann 1 g Ammoniummolybdat /kg Trockensubstanz zugesetzt, anschl. verglüht.

Proben mit Zugaben von 2 ml 50%iger TCA (=Probe 2) zeigten keinerlei Azetylenreduktion. Ungewöhnlich hohe Reduktionsraten hingegen zeigte der autoklavierte Schlamm mit Zugaben von 2 ml konz. NaOH (=Probe 3). Sie erreichten eine Größenordnung, wie sie in biologisch aktiven Proben bei 15 °C Inkubationstemperatur zu erwarten gewesen wäre. Eine Erklärung für diese ungewöhnlich hohe Azetylenreduktion kann nicht gegeben werden, biologischen Ursprungs kann sie nach den gegebenen Verhältnissen keinesfalls sein. Bei dem ausgeglühten Schlamm zeigte nur die Probe 4 in den ersten 24 h eine geringfügige Azetylenreduktionsrate von 20,7 nMol $\text{C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ Asche, auch diese ist nicht erklärbar. Die übrigen Proben zeigten keinerlei Aktivität.

4.3. Der Verlauf der Azetylenreduktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

In zahlreichen Arbeiten zur Stickstofffixierung wird empfohlen, die Inkubationszeiten bei verschiedenen Tests der Nitrogenase möglichst kurz zu wählen. Diese schwanken zwischen einigen Minuten bis zu wenigen Stunden. Sie beziehen sich alle auf Versuche mit reinen Enzymen. Die hier vorliegende Arbeit untersuchte jedoch ökologische Fragen, die nicht durch Kurzzeittests zu beantworten waren. Es erschien daher notwendig, die Inkubation der Proben mehrtägig durchzuführen mit täglicher stichprobenartiger Überprüfung, um den Grad der Beeinflussung und die Reaktion der diazotrophen Bakterien an aufeinanderfolgenden Tagen zu ermitteln. Aus diesem Grunde wurde der Verlauf der natürlichen Azetylenreduktion ohne Chemikalieneinflüsse während der ersten vier Tage untersucht. In Tab. 12 wurden die Mittelwerte der Reduktionsraten und Anzahl nMol C_2H_4 gebildet und in Abb. 19 grafisch aufgetragen. Ferner wurden für jeden der vier Inkubationstage die im Untersuchungszeitraum überhaupt festgestellten höchsten und niedrigsten Reduktionsraten als Hüllkurven der Mittelwertskurve aufgetragen.

In den ersten 24 h traten die höchsten Azetylenreduktionsraten auf. Setzt man den Mittelwert des ersten Tages als Ausgangswert gleich 100%, so betragen die Mittelwerte der Reduktionsraten an den folgenden drei Tagen noch 56%, 44% und 30% dieses Ausgangswertes. Während vom ersten zum zweiten Inkubationstag die Azetylenreduktionsraten um fast die Hälfte abnahmen, sanken sie vom 2. zum 3. Tag um weitere 12%, bzw. vom 3. zum 4. Tag nochmals um 14% ab. Der starke Abfall am 2. Tag könnte auf ein teilweises Absterben der diazotrophen Bakterienfauna zurückzuführen sein, das sich am 3. und 4. Tag verlangsamt fortsetzte. In einem Langzeitversuch, der über 200 h ging, stiegen nach 92 h die Reduktionsraten wieder an. Sie waren nach 4 Tagen auf einen Tiefststand von $30 \text{ nMol } C_2H_4 \times h^{-1} \times kg^{-1}$

Tab. 12: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktion von der Inkubationszeit (25°C, anaerob, Mittelwerte aus zwei Parallelproben).

Inkub.- Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h				
Datum (1974)	Red.- Rate $\frac{\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\frac{\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\frac{\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\frac{\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}}$	nMol C_2H_4 /kg
7. 5.	155,1	3722	100,0	6122	161,0	9986	39,0	10922
10. 6.	235,7	5897	119,0	8753	64,3	10296	49,4	11452
21. 6.	171,7	4121	117,9	6951	81,3	8902	58,8	10409
1. 7.	224,5	5388	141,4	8782	108,0	11374	78,5	13114
11. 7.	192,0	4606	113,3	7303	83,9	9317	38,7	10102
22. 7.	152,6	3662	107,9	6852	73,6	8218	--	--
29. 7.	129,3	3103	80,6	5057	68,0	6669	45,4	7761
9. 8.	179,8	4315	122,1	8450	104,2	10951	--	--
5. 8.	207,2	4973	148,7	8542	90,7	10719	72,2	12637
11. 8.	143,0	3432	99,6	5822	90,3	7989	11,6	8315
26. 8.	136,5	3276	90,1	5438	49,7	6631	51,3	7862
7. 10.	131,3	3151	85,4	5801	79,1	7099	60,0	8339
20. 10.	111,3	2748	37,6	3650	61,1	5116	71,5	6832
4. 11.	165,0	3960	85,9	6022	53,8	7313	35,9	8175
4. 11.	120,1	2882	93,0	5114	32,2	6073	38,6	6855
11. 11.	147,6	3542	45,8	4641	75,0	6441	50,6	7655
25. 11.	232,0	5568	91,6	7766	37,2	9139	63,6	10665
2. 12.	183,5	4404	83,1	6398	59,7	7831	62,4	9329
9. 12.	335,2	5645	84,4	7671	65,2	9256	67,0	10844
16. 12.	223,0	5352	65,1	6918	66,5	8510	42,9	9540
MW	174,5	4188	98,1	6542	76,6	8380	51,8	9623
% des Ausgangs- wertes	100		56		44		30	

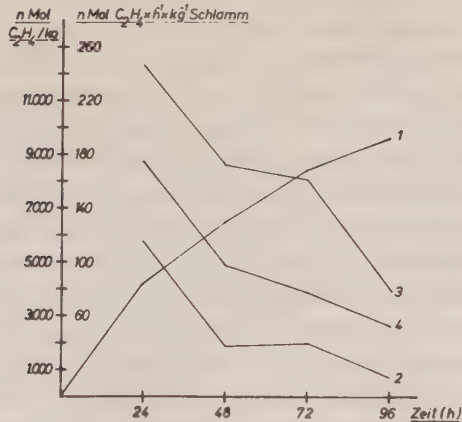


Abb. 19: Der Verlauf der anaeroben Azetylenreduktion während 96 h Inkubationszeit.

- 1: Anzahl der anaerob gebildeten nMol Äthylen pro kg Schlamm für den 1.-4. Inkubationstag, Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse des Jahres 1974;
- 2: niedrigste, und
- 3: höchste Azetylenreduktionsraten im gleichen Untersuchungszeitraum;
- 4: Mittelwerte aller anaeroben Azetylenreduktionsraten im Untersuchungsjahr 1974.

abgesunken, verdoppelten sich dann nach 1 1/2 Tagen (insgesamt 126 h) auf $60 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ und stiegen nach weiteren 2 1/2 Tagen nochmals um den Betrag von $40 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ auf $100 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ an. Dies dürfte auf Adaptationsercheinungen der überlebenden Bakterien an das neue C_2H_2 -haltige Substrat mit einer nach 4 Tagen einsetzenden Zellvermehrung zurückzuführen sein.

5. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von höheren Ammoniumgehalten

Zu Beginn dieses Kapitels soll noch einmal auf die positiv lineare Beziehung zwischen dem natürlichen Ammoniumgehalt des Schlammes und seiner anaeroben Azetylenreduktionsrate hingewiesen werden (vergl. Abschnitt 3.2., Tab. 3, Abb. 6 und 7). Es war zu untersuchen, welchen Einfluß dem Schlamm zusätzlich zugegebenes Ammonium auf die Azetylenreduktion hat.

Der Ammoniumgehalt des Schlammes an der Entnahmestelle F schwankte im Jahresmittel um 178 mg/kg , dies entspricht rund 10 mMol (Tab. 5). Diese Grundbelastung wurde bei den zusätzlichen Ammoniumdosierungen nicht berücksichtigt. Die absoluten Ammoniumkonzentrationen müssen daher gegebenenfalls um 10 mMol nach oben korrigiert werden. Zwei Versuchsreihen wurden mit Ammoniumgehalten bis zu $100 \text{ mMol NH}_4^+/\text{kg}$ durchgeführt, mit je 10 mMol Differenz. Dabei wurde festgestellt, daß bei Zugaben bis zu $50 \text{ mMol NH}_4^+/\text{kg}$ grundsätzlich eine Erhöhung der Reduktionsraten im Vergleich zu den Blindproben auftrat. Die höchsten Reduktionsraten überhaupt wurden bei $20 \text{ mMol NH}_4^+/\text{kg}$ ermittelt. Bei Zugaben von $60 - 100 \text{ mMol NH}_4^+/\text{kg}$ trat teils eine Förderung, teils bereits eine Hemmung der Azetylenreduktion ein, wobei an verschiedenen Versuchstagen bei gleichen Ammoniumkonzentrationen sowohl Hemmungen wie Förderungen eintraten. Hier konnte kein einheitliches Bild gewonnen werden. Aus diesem Grunde wurden bei den weiteren Untersuchungen größere Konzentrationsunterschiede in den Ammoniumzugaben gewählt, wobei sich die

Tab. 13: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von höheren Ammoniumgehalten.
(Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse).

Inkub.- Zeit	24 h		48 h		72 h		96 h	
nMol NH_4^+ /kg Schlamm	Red.- Rate C_2H_4 $\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate C_2H_4 $\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate C_2H_4 $\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate C_2H_4 $\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg
BP	164,5	3947	94,0	6202	67,8	7830	44,1	8842
20	216,4	5194	142,3	8609	121,8	11532	32,8	12319
40	189,4	4546	111,7	7226	87,4	9323	90,4	11493
80	165,2	3965	91,4	6158	72,0	7886	71,1	9706
120	145,4	3489	68,3	5128	51,7	6368	49,3	7551
160	130,0	3110	61,9	4596	52,8	5862	44,8	6937
200	111,8	2683	42,0	3691	41,2	4679	47,9	5827
240	90,5	2171	44,6	3240	24,8	3835	38,3	4754
280	73,6	1766	34,8	2601	25,2	3204	16,7	3604
320	62,5	1500	27,7	2165	24,1	2742	15,9	3123
360	58,1	1393	28,4	2073	23,1	2627	20,2	3110
400	42,8	1026	23,0	1678	23,0	2131	16,8	2533
500	28,4	682	6,0	826	26,0	1450	23,5	2014

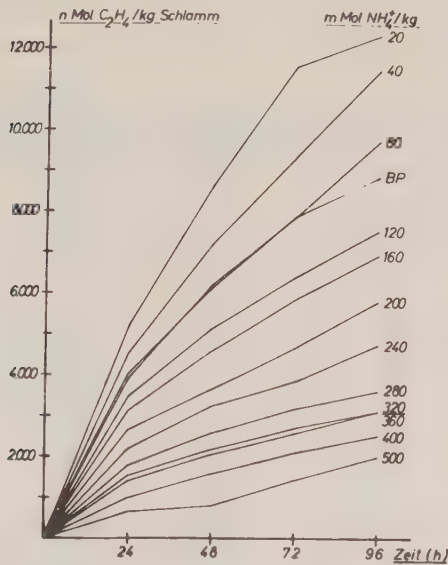


Abb. 20: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom zugegebenen Ammoniumgehalt.

Intervalle von 40 mMol NH_4^+ /kg als günstig erwiesen, weil sie eindeutiger Ergebnisse lieferten. Die Mittelwerte der Untersuchungsergebnisse sind aus Tab. 13 und Abb. 20 ersichtlich.

Die Azetylenreduktionsraten lagen bis zu Zugaben von 80 mMol NH_4^+ /kg Schlamm höher als die der Blindproben. Eine deutliche Verlangsamung setzte zwischen 80 - 120 mMol NH_4^+ /kg ein. Von diesem Konzentrationsbereich an überwog in dem hier untersuchten Biotop die Nitrogenase-Hemmung im Vergleich zur Wachstumsförderung. Ab 500 mMol NH_4^+ /kg kam die biologische Stickstofffixierung praktisch zum Erliegen.

Dieser letztgenannte Wert stammte aus orientierenden Vorversuchen zur Abgrenzung der Ammoniumzugaben, die bis zu 1000 mMol NH_4^+ /kg durchgeführt wurden. Die Anzahl der gebildeten nMol C_2H_4 bei Dosierungen von 600 - 1000 mMol NH_4^+ /kg unterschieden sich nur unwesentlich von denen bei 500 mMol NH_4^+ /kg. Der Vollständigkeit halber sollen die Mittelwerte dieser Reduktionsraten mit aufgeführt werden.

Tab. 14: Mittelwerte der Azetylenreduktionsraten und Anzahl nMol C_2H_4 /kg bei Dosierungen zwischen 500 - 1000 mMol Ammonium pro kg Schlamm.

Inkub.- Zeit (h)	Red.- Rate $\text{xh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg
24	26,5	636
48	7,2	809
72	25,1	1411
96	21,4	1925

Die Abb. 20 zeigt, daß zwischen 80 und 120 mMol NH_4^+ /kg ein großer Unterschied in der Anzahl der gebildeten nMol C_2H_4 besteht, während die Unterschiede in den übrigen Konzentrationsstufen mehr oder weniger gleichmäßig sind. Lediglich die Kurven für 320 und 360 mMol NH_4^+ /kg verlaufen sehr dicht beieinander. Berechnet man

die Differenzen der gebildeten nMol C_2H_4 von Stufe zu Stufe nach jedem Inkubationstag zwischen 120 und 500 mMol NH_4^+ und bildet aus den 8 Ergebnissen einen Mittelwert, so ergeben sich folgende Unterschiede:

	MW der Differenzen an gebildeten nMol C_2H_4 /kg
nach 24 h	351
nach 48 h	538
nach 72 h	615
nach 96 h	693

Die Differenzen werden mit fortschreitender Inkubationszeit immer größer, d.h. je länger hohe Ammoniumkonzentrationen auf diazotrophe Bakterien einwirken, desto größer wird die Hemmung der Stickstofffixierung. Liegen die Reduktionsraten während der ersten 24 h noch ziemlich dicht beisammen, divergieren sie mit jedem weiteren Inkubationstag immer mehr.

6. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Nitratgehalt

=====

Da Literaturangaben zur Abhängigkeit der Azetylenreduktion vom Nitratgehalt spärlich sind, wurden die ersten Untersuchungen willkürlich bei einem Nitratgehalt von 20 - 200 mMol NO_3^- /kg durchgeführt, mit je 20 mMol Differenz.

Tab. 15: Mittelwerte der Untersuchungsergebnisse zur Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Nitratgehalt bei Zugaben von 20 - 200 mMol NO_3^- /kg Schlamm.

Inkub.- Zeit (h)	Red.- Rate $xh^{-1}kg^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg
24	15,5	372
48	4,9	490
72	4,3	593
96	4,4	699

Tab. 16: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Nitratgehalt.
(Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse).

Inkub.- Zeit	24 h		48 h		72 h		96 h	
nMol NO_3^-/kg Schlamm	Red.- Rate $\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{zh}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg
BP	184,2	4420	111,7	7101	74,8	8897	46,5	9602
bis 0,1	245,3	5886	87,9	7996	49,7	9188	73,1	10943
0,2	164,4	3950	117,8	6777	86,1	8843	37,8	9750
0,4	134,7	3233	86,8	5316	81,4	7270	77,4	9128
0,5	127,5	3060	77,0	4908	59,2	6329	34,1	7146
1,0	107,1	2570	68,3	4208	53,2	5484	37,8	6391
1,5	94,6	2270	70,4	3961	43,7	5010	40,1	5972
2,0	83,2	1996	66,5	3592	35,7	4450	41,0	5433
2,5	75,4	1809	59,6	3240	40,7	4216	33,1	5010
3,0	75,1	1803	54,9	3120	44,0	4177	35,2	5021
3,5	70,7	1696	50,8	2915	37,6	3818	36,2	4686
4,0	69,1	1658	51,0	2882	39,0	3817	38,5	4741
4,5	65,7	1578	41,3	2569	36,6	3447	32,7	4232
5,0	60,9	1461	43,7	2510	36,5	3386	35,2	4232
10,0	15,5	372	4,9	490	4,3	593	4,4	699

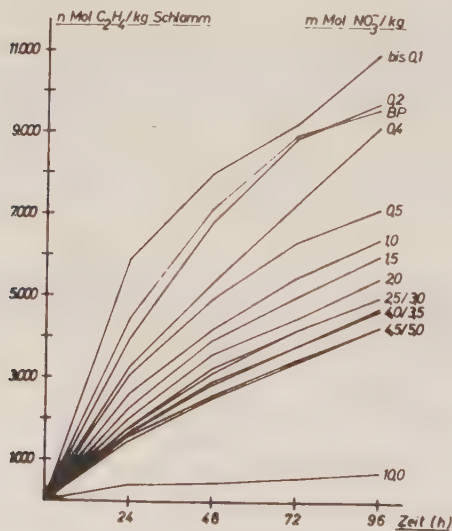


Abb. 21: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Nitratgehalt.

In keiner Probe war eine nennenswerte Azetylenreduktion zu verzeichnen. In allen Konzentrationsstufen war sie etwa gleichhoch. In Tab. 15 wurden die Gesamtmittelwerte dieser Messungen angegeben.

Zusätzliche orientierende Vorversuche wurden im Spurenbereich von 0,01 bis 0,1 mMol NO_3^-/kg durchgeführt, mit je 0,01 mMol Differenz, drei weitere Serien mit Gehalten von 0,2, 0,4 und 10 mMol NO_3^-/kg . Die Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse sind aus Tab. 16 und Abb. 21 ersichtlich.

Bei Nitratzugaben im Spurenbereich lagen die Azetylenreduktionsraten deutlich über den nitratfreien Blindproben. Nitrat selbst war im Schlammssediment des Hartkortsees nicht nachweisbar (vergl. Abschnitt 3.3.). Bereits bei Nitratgehalten ab 0,2 mMol/kg setzte eine Hemmung der Stickstofffixierung ein. Erst während des vierten Inkubationstages schnitt die Reduktionskurve der nitrathaltigen Proben die Blindkurve. Ein deutlicher Sprung war zwischen 0,2 und 0,4 mMol NO_3^-/kg zu beobachten. Mit weiter steigenden Nitratgehalten sanken auch die Reduktionsraten ab. Bei 10 mMol NO_3^-/kg kam die bakterielle Stickstofffixierung praktisch zum Erliegen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß bereits bei geringen Nitratgehalten ab 0,2 mMol NO_3^-/kg eine merkliche Hemmung der Azetylenreduktion einsetzte. Bei 1,5 mMol NO_3^-/kg wurden nach 96 h Inkubationszeit nur noch genau halb soviel nMol C_2H_4 gebildet, wie bei Zugaben bis zu 0,1 mMol NO_3^-/kg . Nitratgehalte im Spurenbereich förderten die Azetylenreduktion, bei Gehalten ab 10 mMol kam sie gänzlich zum Erliegen.

7. Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck und Jahresgang der aeroben und anaeroben Stickstofffixierung

=====

Vor der gaschromatographischen Untersuchung war zu klären, ob durch die teilweise hohen Sauerstoffgehalte in den Proben eine Beeinflussung der FID-Flamme und damit eine Verfälschung der Meßergebnisse eintreten würde. Dazu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- 1.) Injektion von 0,5 ml reinem Sauerstoff in den GC. Die Basislinie am Schreiber änderte sich dadurch nicht und es traten auch keine zusätzlichen Signale an oder in der Nähe der Äthylen- bzw. Azetylen-peaks auf.
- 2.) Kontrolle des Testpeaks für 0,656 nMol Äthylen. Der zweiten WINKLER-Flasche wurden 20 ml N_2 entnommen und durch das gleiche Volumen Sauerstoff ersetzt, anschließend 1 ml der 1. Verdünnung zugegeben. Der "aerobe" Testpeak änderte seine Höhe nicht im Vergleich zum "anaeroben".
- 3.) Untersuchung des Einflusses der Inkubationszeit. Einer Inkubationsflasche ohne Schlamm wurden einige Tropfen A. dest., 20 ml O_2 und 3 ml C_2H_2 zugegeben und im Wasserbad mit den übrigen Proben inkubiert und untersucht. Es traten während der 96 stündigen Inkubation keine weiteren peaks auf.

Aus diesen Versuchen war zu schließen, daß auch durch hohe Sauerstoffgehalte in den Proben keine Verfälschung der Ergebnisse eintrat und die Auswertung nach der geschilderten Peakhöhenmethode durchgeführt werden konnte. Die Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse sind aus Tab. 17 und Abb. 22 ersichtlich.

Die Abbildung zeigt eine deutliche Dreiteilung. Einmal der Bereich mit Sauerstoffpartialdrücken von 0,02 bis 0,10 atm. Die Kurven verlaufen dicht unterhalb der anaeroben Blindproben. Die geringen Sauerstoffgehalte genügten offensichtlich bereits, um eine teilweise Inaktivierung der Nitrogenase anaerober Stickstofffixierer her-

Tab. 17: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck.
(Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse).

Inkub.- Zeit	24 h			48 h			72 h			96 h		
p_{O_2} /atm	Red.- Rate $zh^{-1}kg^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg		Red.- Rate $zh^{-1}kg^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg		Red.- Rate $zh^{-1}kg^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg		Red.- Rate $zh^{-1}kg^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	
0,00	204,4	4906		112,8	7613		84,2	9634		59,9	11072	
0,02	185,3	4447		90,9	6629		84,1	8647		76,0	10471	
0,04	168,5	4044		83,5	6048		99,5	8436		98,4	10798	
0,06	172,4	4138		86,1	6204		112,2	8897		127,3	11952	
0,08	170,7	4097		71,6	5815		85,7	7872		97,5	10212	
0,10	117,9	2830		55,7	4167		147,8	7714		129,2	10815	
0,12	146,0	3504		61,2	4973		302,2	12226		193,7	16875	
0,14	103,1	2474		50,7	3691		272,1	10221		169,0	14277	
0,16	140,0	3360		59,8	4795		199,9	9593		138,8	12924	
0,18	143,0	3432		62,5	4932		306,3	12286		166,8	16289	
0,20	145,7	3497		63,9	5031		150,3	8638		170,2	12723	
0,25	136,5	3276		56,6	4634		155,3	8361		111,3	11032	
0,30	137,2	3293		75,6	5107		75,6	6921		66,0	8505	
0,35	123,9	2974		54,5	4282		64,8	5837		67,3	7452	
0,40	125,2	3005		47,9	4155		89,9	6313		74,1	8091	
1,00	77,9	1870		31,3	2621		30,7	3358		16,6	3756	

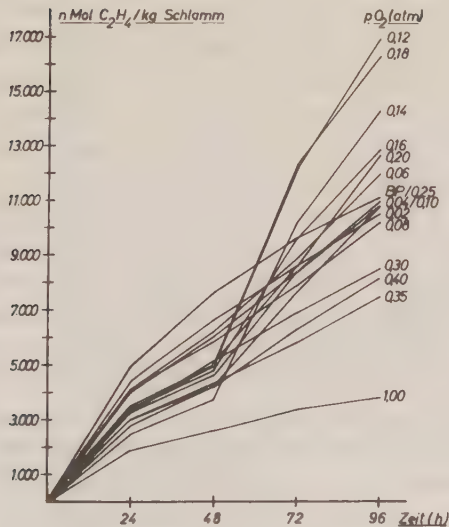


Abb. 22: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck.

beizuführen. Der Bereich von 0,12 bis 0,20 atm lag deutlich über den Blindproben, was auf die Förderung der aeroben N_2 -Fixierer gegenüber den Anaerobiern zurückzuführen war. Die höchsten Reduktionsraten zeigten die Proben mit einem pO_2 von 0,12 atm. Bis zu Sauerstoffpartialdrücken von 0,20 atm war ein langsames Absinken der Reduktionsraten festzustellen. Bei einem pO_2 von 0,25 atm wurden nach 96 h Inkubationszeit aerob wie anaerob die gleiche Anzahl nMol C_2H_4 gebildet. Allen diesen Proben gemeinsam war der starke Anstieg nach 48 h Inkubationszeit. Dies ließe sich so erklären, daß die aeroben N_2 -Fixierer zunächst nur in geringer Anzahl vorhanden waren. Den nach zwei Tagen einsetzenden höheren Fixierungsraten könnte eine entsprechende Zellvermehrung parallel gegangen sein. Wie schon von anderen Autoren an stickstofffixierenden Systemen festgestellt wurde, lagen auch bei dem hier untersuchten natürlichen Schlammssediment die optimalen Sauerstoffpartialdrücke für die aerobe Stickstofffixierung unter dem atmosphärischen Sauerstoffpartialdruck. Bei 0,2 atm pO_2 war das Aktivitätsmaximum bereits überschritten. Der dritte Bereich in Abb. 22 wird eingenommen von den Reduktionsraten, die bei sehr viel höheren pO_2 , als unter atmosphärischen Bedingungen durchgeführt wurden. Sie lagen erheblich unter den anaeroben Blindproben und auch noch deutlich unter den Proben mit geringen Sauerstoffgehalten. Erstaunlich war, daß selbst noch unter reiner Sauerstoffatmosphäre die Azetylenreduktion, wenn auch in sehr bescheidenem Umfang, durchgeführt wurde. Mit fortschreitender Inkubationszeit wurde sie aber immer geringer und lag während des vierten Tages nur noch bei rund $17 \text{ nMol } C_2H_4 \times h^{-1} \times kg^{-1}$ Schlamm. Dies deutet auf eine langsam fortschreitende Inaktivierung der Nitrogenase hin. Die Stickstofffixierer haben auch in dem "Kleinbiotop Inkubationsfläschchen" zunächst noch die Möglichkeit, ihre Nitrogenase vor dem Angriff des Sauerstoffs durch Schlammpartikel und Schleimbildung teilweise zu schützen, so daß zumindest ein Teil der aeroben diazotrophen Bakterien-

fauna trotz hoher Sauerstoffpartialdrücke im Gasraum der Flaschen noch Lebensbedingungen vorfand, die nicht sofort zu einer völligen Inaktivierung der Nitrogenase führten. Die "switching on" und "switching off" Prozesse, die aerobe Stickstofffixierer zum Schutz ihrer Nitrogenase durchführen können, sind bereits im Abschnitt 1.3.2. eingehend diskutiert worden. Bei diesen Untersuchungen fiel weiterhin auf, daß die aeroben Azetylenreduktionsraten in den Wintermonaten sehr hoch waren, während der Sommermonate aber in einzelnen Fällen sogar hinter den anaeroben Reduktionsraten zurückblieben. Zur Beantwortung der Frage, ob eine Abhängigkeit der Azetylenreduktion von der Jahreszeit besteht, wurden die gebildeten nMol C_2H_4 nach 96 h Inkubationszeit bei 25 °C monatsweise aufgeführt.

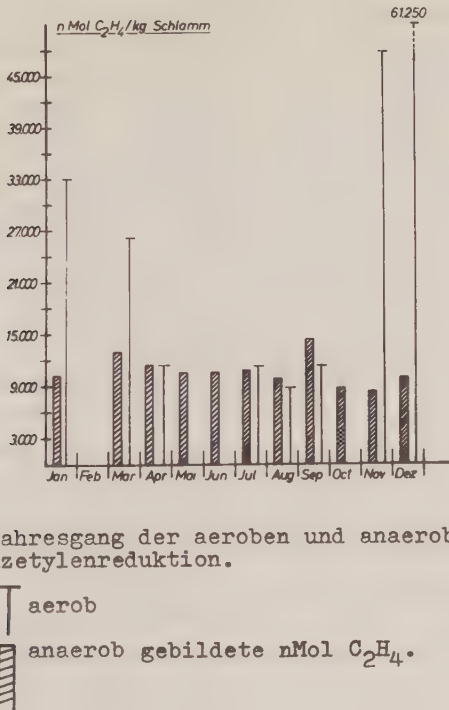


Abb. 23: Jahresgang der aeroben und anaeroben Azetylenreduktion.

Dazu dienten einerseits die zu jeder Versuchsserie mitlaufenden anaeroben Blindproben, andererseits die mit einem pO_2 von 0,12 und 0,18 atm aerob inkubierten Schlammproben. Es wurden diese beiden Sauerstoffpartialdrücke gewählt, weil sie die höchsten Reduktionsraten zeigten und die beiden Kurven während der 96 h Inkubationszeit fast kongruent verliefen (vergl. Abb. 22). Von den anaerob bzw. aerob gebildeten nMol C_2H_4 wurden die Monatsmittelwerte gebildet und in Abb. 23 dargestellt. Die anaeroben Azetylenreduktionsraten waren während des ganzen Jahres ziemlich gleichmäßig. Ausgeprägte Spitzen waren nicht festzustellen. Berechnet man über das ganze Jahr die Standardabweichung, so beträgt diese rund 16%. Leicht erhöhte Azetylenreduktionen wurden nur in den Monaten März und September festgestellt.

Starken Schwankungen unterlagen aber die aeroben Azetylenreduktionsraten. Während des späten Frühjahrs und der Sommermonate, hier von April bis September, waren sie sehr niedrig. Sie lagen noch unter den anaeroben Reduktionsraten. Während dieser Monate wurden in 96 h im Mittel 11500 nMol C_2H_4 anaerob gebildet, in der gleichen Zeit aerob nur 10700 nMol C_2H_4 . Ein starker Anstieg auf das fünf- bis sechsfache war im November und Dezember feststellbar. Danach sanken die aeroben Reduktionsraten von Januar bis März langsam ab und erreichten im April ihren sommerlichen Niedrigstand. Diese Erhöhung der Reduktionsraten, die mit einer Vermehrung der aeroben Stickstofffixierer verbunden sein müsste, kann nur auf die niedrigeren Wassertemperaturen in den Wintermonaten mit höheren Sauerstoffgehalten im Wasserkörper des Harkortsees zurückgeführt werden, was eine Entwicklungsförderung der Aerobier an der Schlammoberfläche zur Folge hätte. Ein deutlicher Sprung in der Wassertemperatur war von Oktober mit 11,7 °C bis November mit 7,6 °C festzustellen. Betrachtet man für diese Wassertemperaturen die Sauerstoffsättigungswerte, so liegen sie für Oktober bei 10,5 mg O_2/l und im November bei 11,6 mg O_2/l . Eine unmittelbare Förderung der diazotrophen Aerobier durch Stoffe, die im Winter

und Frühjahr durch Zersetzung des organischen Materials im Schlamm freigesetzt werden, kann nicht gegeben sein, da eine merkliche Erhöhung der Oxidierbarkeit und anderer organischer Parameter erst ab Dezember/Januar festzustellen war (vergl. Abschnitt 3.3.). Dieses Nährstoffangebot kam für eine unmittelbare Förderung der Aerobier zu spät. So bleibt festzuhalten, daß in den Wintermonaten bei demselben Schlammsystem mit einer fünf- bis sechsfach höheren aeroben Stickstofffixierung als in den Frühjahrs- und Sommermonaten zu rechnen ist, bei jährlich annähernd gleichbleibender anaerober Stickstofffixierung.

8. Die Abhängigkeit der aeroben Azetylenreduktionsrate von Antibiotika-Zugaben

=====

Die Untersuchungen wurden mit den Antibiotika NEOMYCIN, STREPTOMYCIN und PENICILLIN, sowie einer Mischung gleicher Teile dieser drei Antibiotika durchgeführt.

Bereits bei Gehalten von 0,02 mg Antibiotikum pro 5 g Schlamm ($\hat{=}$ 10 mg/l wässriger Lösung) wurden nach 96 h Inkubationszeit im Mittel nur noch rund 55% des Äthylens der antibiotikafreien Vergleichsproben gebildet (siehe Tab. 18). Diese Hemmung der Reduktionstätigkeit betraf alle Proben etwa gleichmäßig. Während der ersten 24 h verliefen die Kurven der Meß- und Blindproben fast kongruent, was darauf schließen ließ, daß die Antibiotika in diesem Konzentrationsbereich bakteriostatisch und nicht bakterizid wirkten. Während des zweiten Inkubationstages divergierten die Kurven mehr, aber erst während des dritten und vierten Tages, wo eine deutliche Vermehrung der aeroben Stickstofffixierer in den Blindproben einsetzte, war ein damit einhergehender Anstieg der Azetylenreduktion bei den antibiotikahaltigen Proben nicht festzustellen. Nur die Proben, die eine Mischung aus gleichen Teilen NEOMYCIN, STREPTOMYCIN und PENICILLIN enthielten, zeigten einen gewissen Anstieg. Dies ist vielleicht so zu erklären, daß durch die Mischung der drei Antibiotika die Ent-

Tab. 18: Die aerobe Azetylenreduktionsrate unter Einfluß von Antibiotika.

Inkubationszeit	24 h		48 h		72 h		96 h	
	Red.- Rate $\text{mM}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{mM}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{mM}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg	Red.- Rate $\text{mM}^{-1}\text{kg}^{-1}$	nMol C_2H_4 /kg
anaerobe Proben ohne Antibiotika (BP)	182,4	4378	112,7	7083	69,2	8744	60,7	10201
aerobe Proben ohne Antibiotika (BP)	72,6	1742	40,9	2724	192,9	7354	123,6	10320
Schlamm + Neomycin (10 mg/l), aerob	78,5	1884	28,2	2561	76,2	4390	80,7	6327
Schlamm + Streptomycin (10 mg/l), aerob	75,3	1807	15,7	2184	53,3	3463	98,6	5829
Schlamm + Penicillin (10 mg/l), aerob	72,2	1733	26,9	2379	42,5	3399	76,0	5223
Schlamm + Neomycin + Streptomycin + Penicillin (je 10 mg/l), aerob	73,1	1754	34,6	2584	80,9	4526	146,3	8037

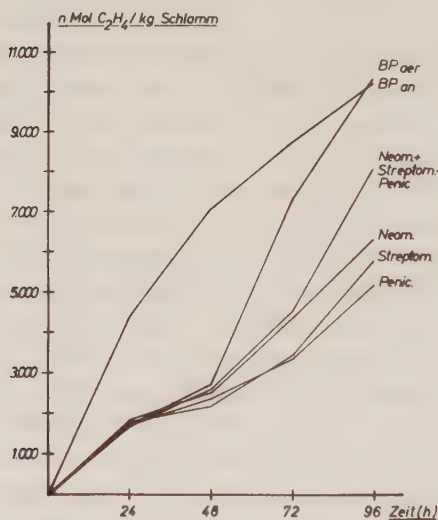


Abb. 24: Die Abhängigkeit der aeroben Azetylenreduktionsrate von Antibiotika-Zugaben.
 BP_{aer}: aerób, BP_{an}: anaerob inkubierte Blindproben. Neom.: NEOMYCIN, Streptom.: STREPTOMYCIN, Penic.: PENICILLIN.
 Konzentration der Antibiotika: 10 mg/l wässriger Lösung ($\hat{=}$ 0,02 mg/5 g Schlamm).

wicklung der nicht stickstofffixierenden Bakterien gehemmt wurde, so daß die diazotrophen Bakterien bessere Lebens- und Entwicklungsmöglichkeiten vorfanden. Die Abb. 24 zeigt darüberhinaus, daß die aeroben Stickstofffixierer gleichermaßen empfindlich sind gegen PENICILLIN und STREPTOMYCIN, eine etwas geringere Hemmung dagegen durch NEOMYCIN hervorgerufen wurde. Demnach müßten sowohl aerobe gram-positive wie auch gram-negative Stickstofffixierer im Schlamm des Hartkortesee vorhanden sein.

Tab. 19: Die prozentuale Abnahme der aeroben Azetylenreduktion unter Einfluß verschiedener Antibiotika und Antibiotika-Konzentrationen.

Antibiotika	Konzentration in mg/l wässriger Lösung	pO ₂ : 0,10 atm (BP)		pO ₂ : 0,14 atm (BP)	
		Anzahl der gebildeten nMol C ₂ H ₄ nach 96 h Inkubationszeit:		Anzahl der gebildeten nMol C ₂ H ₄ nach 96 h Inkubationszeit:	
		10469 (= 100 %)		10464 (= 100 %)	
		nMol C ₂ H ₄ / kg n. 96 h Inkub.-zeit	% von Blindproben	nMol C ₂ H ₄ / kg n. 96 h Inkub.-zeit	% von Blindproben
Neomycin	10	6448	62	6201	61
	100	5618	54	7029	69
	1000	3464	33	4005	39
Streptomycin	10	5573	53	6082	60
	100	3998	38	5064	50
	1000	2623	25	3000	30
Penicillin	10	5501	53	4939	49
	100	5547	53	5419	53
	1000	2932	28	2837	28
Neomycin + Streptomycin + Penicillin	je 10	9843	94	5226	51
	je 100	4836	46	3995	39
	je 1000	3172	30	1697	17

Mittelwerte aller Proben bei Antibiotika-Gehalten von:

10 mg/l	55,57 % der Blindproben
100 mg/l	50,25 % der Blindproben
1000 mg/l	28,75 % der Blindproben

Eine Verzehnfachung der Antibiotika-Gehalte von 10 auf 100 mg/l wässriger Lösung brachte nur eine unwesentliche Abnahme der Azetylenreduktion. Im Mittel sank sie um 5,5% auf 50,25% der Blindproben ab. Erst eine weitere Verzehnfachung der Gehalte auf 1000 mg/l brachte eine stärkere Hemmung der Azetylenreduktion, wobei der Mittelwert aller Proben auf 28,75% der Bezugsproben absank. Diese Antibiotika-Konzentrationen

sind jedoch unphysiologisch und bakterizid (vergl. Tab. 19).

Aus diesen Untersuchungsergebnissen kann gefolgert werden, daß die bei den Untersuchungen zur "Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck" ermittelten Reduktionsraten bis zu 2100 nMol $C_2H_4 \times h^{-1} \times kg^{-1}$ im natürlichen Schlammsediment ohne Zugabe von Nährmedien biogenen Ursprungs waren. Im Falle der chemischen Reduktion des Azetylen wären auch unter Antibiotikaeinwirkung diese hohen Reduktionsraten aufgetreten.

9. Berechnungen zur bakteriellen Stickstofffixierung und zur Denitrifikation im Harkortsee

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß sowohl stickstofffixierende aerobe, wie auch fakultativ und obligat anaerobe Bakterien im Schlamm des Harkortsees vorhanden sind. Aus diesem Grunde soll der zusätzliche bakterielle Stickstoffeintrag in den See über die Stickstofffixierung berechnet werden. Auch die Denitrifikation soll abgeschätzt werden.

9.1. Jährlich anaerob fixierte Stickstoffmenge

Die Formel zur Bilanzierung der Stickstofffixierung und die experimentelle Bestimmung des Umrechnungsfaktors zur Berechnung der Stickstofffixierung aus der Azetylenreduktion wurden bereits in Abschnitt 2.1.1. erläutert. Im Jahresmittel 1974 betrug die stündlich gebildete Menge Äthylen 174,5 nMol $\times h^{-1} \times kg^{-1}$ (Tab 12). Setzt man diesen Wert in die Formel ein, so ergibt sich die stündlich fixierte Stickstoffmenge mit:

$$mg N_{fix.} = \frac{0,0001745 \cdot 28 \cdot 1296000 \cdot 10^3}{4,2}$$

$$mg N_{fix.} = 1,508 \cdot 10^6 \text{ mg/h} = 1,508 \text{ kg N/h.}$$

Die letzte Zahlenkombination gibt den Schlammgehalt des Harkortsees in kg an (vergl. Abschnitt 2.6.). Dabei wird unterstellt, daß die N_2 -Fixierung im gesamten Schlammkörper annähernd gleich groß sein soll. Diese im Labor bei 25 °C gemessenen Werte müssen umgerechnet werden auf die Aktivität bei 12 °C, der mittleren Jahrestemperatur des Schlammes im Harkortsee. Die relative Aktivität für 12 °C gegenüber 25 °C beträgt ca. 63%.

$$1,508 \cdot 24 \text{ (h)} \cdot 365 \text{ (d)} = 13210 \text{ kg/a}$$

Davon 63% entsprechen 8322 kg fixiertem Stickstoff im Seesediment pro Jahr. Diese Menge soll ins Verhältnis zu der in der eutrophierten Ruhr vorhandenen Ammoniumfracht gesetzt werden. Der Ammoniumgehalt am Zulauf des Harkortsees beträgt im langjährigen Mittel 1,06 mg/l. Bei einer jährlichen Wasserfracht von rund $2189 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ errechnet sich die Ammoniumfracht mit $2,32 \cdot 10^6 \text{ kg NH}_4^+/\text{a} = 1,81 \cdot 10^6 \text{ kg NH}_4^+-\text{N}$. Die anaerobe Stickstofffixierung im Harkortsee betrug 0,46% der bereits vorhandenen jährlichen Stickstofffracht.

9.2. Jährlich aerob fixierte Stickstoffmenge

Diese Berechnung ist wesentlich schwieriger, weil einerseits die aerobe Stickstofffixierungsrate abhängig ist vom vorhandenen Sauerstoffpartialdruck, dieser aber nicht überall am Seeboden gleich groß ist, andererseits wird die aerobe Stickstofffixierung nur an der aeroben Schlammoberfläche ablaufen, da die tieferen Sedimentschichten völlig anaerob sind. Die dritte Schwierigkeit liegt in dem typischen Jahresgang der aeroben Stickstofffixierung (vergl. Abschnitt 7.). Eine weitere Schwierigkeit lag in der Probenentnahme selbst, wobei die gegebenen mikro-ökologischen Bedingungen verändert wurden. Der anschließend bei definierten Sauerstoffpartialdrücken durchgeführte Azetylenreduktionstest förderte einseitig das Wachstum der aeroben Stickstofffixierer. Die Sauerstoffsättigung über dem Seeboden be-

trug rund 80 % (= 7 mg O_2/l), dies entspricht einem Sauerstoffpartialdruck von 0,14 atm. Für diesen O_2 -Gehalt soll die aerobe Stickstofffixierung berechnet werden, wobei weiterhin angenommen wird, daß etwa die Hälfte des Schlammes im Harkortsee (rund $648000 \cdot 10^3$ kg) den aeroben Stickstofffixierern noch hinreichend gute Lebensmöglichkeiten bietet. Nach 96 h Bebrütungszeit wurden bei einem pO_2 von 0,14 atm im Mittel 14272 nMol C_2H_4/kg gebildet. In die Formel eingesetzt:

$$mg N_{fix.} = \frac{0,014277 \cdot 28 \cdot 648000 \cdot 10^3}{4,2}$$

$$N_{fix.} = 61,677 \text{ kg in 96 h.}$$

Dies entspricht einer jährlich fixierten Stickstoffmenge von 5628 kg. Davon 63 % entspricht einer jährlich aerob fixierten Stickstoffmenge von 3546 kg. Bezogen auf die anaerobe Stickstofffixierung sind dies rund 42,5 %. Die aerobe Stickstofffixierung bezogen auf die jährliche Stickstofffracht der Ruhr beträgt aufgerundet 0,20 %.

9.3. Jährlich durch Blaualgen fixierte Stickstoffmenge

Hierüber können nur Vermutungen angestellt werden, da eigene Untersuchungen fehlen. Nach BURNS & HARDY, (1975) schwanken die mit Blaualgen an verschiedenen Seen gemessenen Stickstofffixierungsraten zwischen 0,4 - 8,0 kg $N_2 \times ha^{-1} \times a^{-1}$. Da im Harkortsee zahlreiche Blaualgenblüten durch MICROCYSTIS beobachtet wurden, soll die jährlich fixierte Stickstoffmenge hier mit 4 kg $N_2 \times ha^{-1} \times a^{-1}$ angenommen werden. Bei einer Seeoberfläche von 140 ha errechnet sich die fixierte Stickstoffmenge mit 560 kg pro Jahr. Dies sind nur 0,03 % der jährlichen Stickstofffracht der Ruhr. Die Ergebnisse sollen noch einmal tabellarisch zusammengefaßt werden (siehe Tab. 20).

Tab. 20: Berechnungen zur jährlichen Stickstofffixierung im Harkortsee

Jährl. Stickstofffracht der Ruhr = $1,81 \cdot 10^6 \text{ kg NH}_4^+-\text{N} / \text{a}$ (= 100 %)

Stickstofffixierer	jährl. fix. Stickstoffmenge (kg)	Prozentsatz an der jährl. N-Fracht der Ruhr
fakultative und obligate Anaerobier	8322	0,46
Aerobier	3546	0,20
Blaualgen (Literaturwert)	560	0,03
Gesamt	12428	0,69

Die gesamte biologische Stickstofffixierung mit 12,5 Jahrestonnen beträgt aufgerundet 0,7 % der natürlichen jährlichen Stickstofffracht der Ruhr am Zulauf des Harkortsees.

Es wurde bereits erwähnt, daß HARDY & HOLSTEN, (1972) die jährlich fixierte Stickstoffmenge in einem Schlamm-system mit 1,83 bis zu 104 mg/kg veranschlagen. Aus den hier vorliegenden Untersuchungsergebnissen errechnet sich die im Schlamm des Harkortsees jährlich fixierte Stickstoffmenge mit 9,16 mg/kg. Dies sind rund 9 % der bisher festgestellten höchsten Aktivitäten, aber fünfmal mehr als die mit $1,83 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1} \times \text{a}^{-1}$ ermittelten niedrigsten Aktivitäten.

9.4. Berechnung der jährlichen Denitrifikation im Harkortsee

Der Ammoniumgehalt im Ablauf des Harkortsees lag im zwölfjährigen Mittel bei 1,30 mg/l. Durch die Einleitung der Kläranlage Hagen mit einer mittleren NH_4^+ -Belastung von 25 mg/l, wurden dem See bei einer Abwasserfracht von $28,733 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ zusätzlich 718325 kg NH_4^+ entsprechend 560294 kg NH_4^+-N jährlich zugeführt. Die Nitratkonzentrationen waren im Zu- und Ablauf des Sees gleich.

Die dem See jährlich insgesamt zugeführte Stickstoffmenge errechnet sich mit:

1.) durch die natürliche Stickstofffracht der Ruhr	1810000 kg
2.) durch die Kläranlage Hagen	560294 kg
3.) durch N_2 -Fixierung insgesamt	12428 kg
Gesamt	2382722 kg

Die Stickstofffracht im Ablauf des Sees beträgt jährlich:

$2189 \cdot 10^6 \text{ (m}^3\text{)} \cdot 1,30 \text{ (g NH}_4^+/\text{m}^3\text{)}$	
$= 2845700 \text{ kg NH}_4^+/\text{a} \cdot 0,78$	- 2219646 kg
Verlust	163076 kg *****

Trotz der im Ablauf des Sees festgestellten etwas höheren Ammoniumkonzentration als im Zulauf, wurden jährlich 163 t Stickstoff durch Denitrifikation wieder aus dem See entfernt. Bezogen auf die dem See insgesamt zugeführte Stickstoffmenge von 2383 t, betrugen die Verluste 6,84 %. Setzt man die Stickstofffixierung und die Denitrifikation zueinander ins Verhältnis, ist die letztgenannte rund 13 fach höher als die Stickstofffixierung.

10. Die Bestimmung der Koloniezahl, Coli-Keimzahl und der fakultativen und obligaten Anaerobier im Schlamm des Harkortsees

Nach den Untersuchungen zur Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von verschiedenen physikalischen und chemischen Faktoren, erfolgte die Bestimmung der Koloniezahl, der Coli-Keimzahl, sowie der Anzahl der obligat und fakultativ anaeroben Bakterien im Schlamm des Harkortsees. Ausgehend von diesen summarischen Keimzahlen wurde der Anteil der stickstofffixierenden Bakterien bestimmt. Eine Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse zeigt Tab. 21. Insgesamt wurden 10 Untersuchungsreihen ausgewertet. Von den 12 Einzel-

die Auswirkung dieser vier Mittel auf die Azetylenreduktion untersucht. Dazu wurden von allen vier Extraktionsmitteln gleichzeitig von den Stufen 0 (unverdünnt), 1 (Verdünnung 1 : 10) und 2 (Verdünnung 1 : 100) steigende Mengen in 10 ml AZOTO-BACTER-Medium (verändert nach DREWS, 1974) pipettiert, 5 Tage bei 30 °C anaerob bebrütet und nach einem weiteren Tag der Azetylenreduktionstest durchgeführt. Eine Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse zeigt Tab 22. Das AZOTOBACTER-Medium, im folgenden kurz "A-Medium" genannt, hatte folgende Zusammensetzung:

Glucose: 10 g/l, Hefeextrakt: 50 mg/l,
 K_2HPO_4 : 200 mg/l, $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$: 1 mg/l,
 KH_2PO_4 : 50 mg/l, Biotin: 10 µg/l.

Der pH-Wert wurde jeweils auf 7,00 eingestellt.

(In Abschnitt 12. wird auf die Untersuchungen zur optimalen Zusammensetzung des Mediums näher eingegangen).

Tab. 22: Beeinflussung der Azetylenreduktionsrate anaerober Stickstofffixierer durch verschiedene Elutionsmittel.
 - keine, + positive Azetylenreduktion.

Verdünnungs- stufe	Zugabe in ml	Azetylenreduktionstest			
		0,9 % NaCl- Lösung	A. dest.	TRIS-Puffer 0,05 M	PO_4 -Puffer 0,025 M
		pH 7,05	pH 7,00	pH 7,20	pH 6,88
0 (unver- dünnt)	0,4	-	-	-	+
	0,6	-	-	-	+
	0,8	-	+	+	+
	1,0	-	-	+	+
1 (1 : 10)	0,4	-	-	-	-
	0,6	-	-	-	-
	0,8	-	-	-	-
	1,0	-	+	-	+
2 (1 : 100)	0,4	-	-	-	+
	0,6	-	-	-	-
	0,8	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-

Physiologische Kochsalzlösung 0,9%ig:

Bei keiner Probe wurde eine positive Azetylenreduktion beobachtet.

Destilliertes Wasser:

Hier bietet sich ein ähnlich negatives Bild. Bei den untersuchten Serien war nur je eine Probe der Stufen 0 und 1 mit höheren Zugaben positiv. Auch dieses Extraktionsmittel ist zur Anreicherung der Stickstofffixierer nicht geeignet.

TRIS-/HCl-Puffer pH 7,20:

Hier waren zwei Proben mit Zugaben von 0,8 und 1,0 ml aus der Stufe 0 positiv. Alle anderen Proben waren negativ.

Phosphat-Puffer pH 6,88:

Dieser Puffer ist von den untersuchten vier Elutionsmitteln zur Extraktion der stickstofffixierenden Anaerobier aus dem Schlamm am besten geeignet. Grundsätzlich waren alle Proben der Stufe 0 positiv, darüberhinaus auch Proben mit Zugaben von 1,0 ml der Verdünnungsstufe 1 : 10. Gelegentlich wurden vereinzelte positive Proben noch in der Verdünnungsstufe 1 : 100 festgestellt. Auch bei der Bestimmung der "Gesamt-Anaerobier" im Schlamm wurden mit dem Phosphatpuffer die höchsten Keimzahlen ermittelt (vergl. Abschnitt 10.).

Ähnliche Ergebnisse erzielten auch BILLSON et al., (1970), die nicht die Stickstofffixierung, sondern die Wiederfindungsquote von aeroben Stickstofffixierern nach Ansetzen der Verdünnungsreihen in verschiedenen Medien untersuchten. Sie stellten bei AZOTOBACTER-Arten fest, daß in physiologischer Kochsalzlösung, wie auch in destilliertem Wasser, die geringsten Bakterienzahlen wiedergefunden wurden. Dies führten die Autoren auf ein teilweises Absterben der Bakterien zurück, hervorgerufen durch den Verlust von Phospholipiden aus der Zellmembran in diesen beiden Medien. Dieser Effekt trat in Puffersystemen, insbesondere in Phosphatpuffer bis 0,05 M, nicht auf (siehe auch CARNAHAN et al., 1960).

Es war nun noch zu prüfen, welchen Einfluß die kurzzeitige Berührung der fakultativ bzw. obligat anaeroben Stickstofffixierer mit dem Luftsauerstoff beim Herstellen der Verdünnungsreihen auf ihre Azetylenreduktion hatte. Dazu wurden zwei Extraktions- und Verdünnungsreihen in Phosphatpuffer angesetzt. Die erste wurde normal ausgeführt, dabei war die intensive Berührung mit dem Luftsauerstoff nicht zu vermeiden. Im Parallelversuch wurde stets unter anaeroben Bedingungen gearbeitet. Der autoklavierte heiße Phosphatpuffer wurde bis zum Erkalten mit Stickstoff durchströmt. Die Luft im Halse des Extraktionskolbens war mit Stickstoff ausgeblasen worden. Die Kapsenberg-Röhrchen für die Verdünnungsstufen waren mit einem Serumstopfen verschlossen und mit Stickstoff ausgegast, die Verdünnungsreihen wurden statt mit Pipetten mit sterilen 1 ml Spritzen angesetzt. Nach dem Verdünnen wurde nochmals mit N_2 ausgegast. Auch die Inkubationsflaschen mit dem Nährmedium wurden vor und nach der Beimpfung mit Stickstoff ausgegast.

Es zeigte sich, daß von den insgesamt 15 Proben jeder Serie bei den streng anaerob gehaltenen Verdünnungen alle Proben der Stufe 0, entsprechend $\frac{1}{3}$ der Gesamtproben, positiv waren. Der gleiche Prozentsatz positiver Proben wurde auch bei den normal angesetzten Verdünnungsreihen ermittelt. Es waren zwei Proben in der Stufe 0, zwei in der Stufe 1 und eine in der Stufe 2 positiv, dabei war kein systematischer Zusammenhang erkennbar. Daraus kann geschlossen werden, daß durch die Berührung mit dem Luftsauerstoff zwar keine irreversible Schädigung der Nitrogenase bei den stickstofffixierenden Anaerobiern, wohl aber eine vorübergehende Inaktivierung eintreten kann.

Aus den streng anaerob gehaltenen Verdünnungsreihen war die Bestimmung des prozentualen Anteiles der Stickstofffixierer an der Gesamtzahl der Anaerobier möglich. Wie bereits erwähnt, waren alle Proben der unverdünnten Stufe, wie auch eine Probe der Verdünnungsstufe 1 : 10

mit 1 ml Zugabe positiv (vergl. Tab. 22). Daraus ist zu folgern, daß unter den hier gewählten Versuchsbedingungen mit Phosphatpuffer zwischen 500 bis 1000 anaerobe Stickstofffixierer aus 1 g Schlamm extrahiert werden können und analytisch nachweisbar sind. Damit stellen die Stickstofffixierer nur 0,3% innerhalb der "Gesamt-Anaerobier".

Vergleichbare Zahlen fanden auch KAWAI & SUGAHARA, (1971) bei ihren Untersuchungen an zwei Süßwasserseen in Japan. Sie ermittelten in den oberen Sedimentschichten am "lake Biwa" und "lake Yunoko" ebenfalls rund 1000 stickstofffixierende Bakterien pro Gramm Schlamm.

12. Untersuchungen zur optimalen Zusammensetzung der Nährlösung zum Anzüchten von Primärkulturen stickstofffixierender Bakterien

12.1. Das Nährmedium

Die Zusammensetzung des in Abschnitt 11. beschriebenen A-Mediums wurde wie folgt ermittelt: Etwa 5 g Schlamm wurden mit verschiedenen Nährstoffen in wässriger Lösung versetzt und der Azetylenreduktionstest aerob und anaerob durchgeführt. Zunächst wurden die in Tab. 23 aufgeführten reinen Lösungen, dann Kombinationen von "positiven" Nährmedien untersucht. Als "positiv" wurde ein Stoff eingestuft, wenn er eine um mindestens 10% höhere Azetylenreduktionsrate gegenüber den unbehandelten Blindproben zeigte. Stickstofffixierende Bakterien können die verschiedensten Zucker und Alkohole als Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden. Wie Tab. 23 zeigt, wurden Mannit und Glucose von den Anaerobiern gleichermaßen gut verwertet, die diazotrophen Aerobier hingegen bevorzugten Glucose. Biotin alleine bewirkte bei den anaeroben Proben eine schwache bis mäßige, bei den aeroben Proben hingegen eine starke Erhöhung der Azetylenreduktion. Dikaliumhydrogenphosphat führte bei beiden Versuchsserien zu einer mäßigen Erhöhung, Natriummolybdat nur bei den aerob inkubierten Proben zu einer

Tab. 23: Untersuchungen zu den Nährstoffansprüchen aerober und anaerober Stickstofffixierer. Von den angegebenen Nährlösungen wurden jeweils 2 ml zu 5 g Schlamm zugegeben.

+++ sehr starke, ++ starke, + schwache bis mäßige Erhöhung der Azetylenreduktion.
0 keine Erhöhung, - Hemmung der Azetylenreduktion.

Nährstoff	Einwaage	pH-Wert	Azetylenreduktions- test nach 96 h	
			anaerob	aerob pO ₂ : 0,14 atm
Mannit	10 g/l	7,50	+++	++
Glucose	10 g/l	7,15	+++	+++
Hefextrakt	5 g/l	6,65	+	-
Pepton	10 g/l	6,55	-	-
Hefextrakt + Pepton	5 g/l 10 g/l	6,60	-	-
Biotin	0,1 mg/l	6,70	+	++
Vitamin B ₁₂	0,1 mg/l	7,35	0	-
Biotin + Vitamin B ₁₂	0,1 mg/l 0,1 mg/l	—	0	-
K ₂ HPO ₄	0,2 g/l	7,45	+	0+
Molybdät als Na ₂ MoO ₄	1,0 mg/l	7,15	0	+
Spurenelement- lösung (s.u.)		6,00	0	0
Mannit + Hefextrakt + K ₂ HPO ₄	10 g/l 5 g/l 0,2 g/l	6,90	+++	+++
Glucose + Hefextrakt + K ₂ HPO ₄	10 g/l 5 g/l 0,2 g/l	6,80	+++	+++
Mannit + Biotin + K ₂ HPO ₄	10 g/l 0,1 mg/l 0,2 g/l	7,10	nicht untersucht	+++

leichten Erhöhung der Azetylenreduktion.

Keine Steigerung, oder gar eine Hemmung der Reduktionstätigkeit, wurde bei Pepton, Vitamin B₁₂, der Kombination von Vitamin B₁₂ + Biotin und bei Spurenelementzugaben beobachtet. Diese Stoffe schieden bei den folgenden Untersuchungen aus. Aus den gleichzeitig laufenden Untersuchungen zur Bestimmung der maximalen Bakterienzahlen im Schlamm des Harkortsees war zu folgern, daß nicht ein Phosphat alleine, sondern ein Phosphatpuffersystem vorteilhaft für die Bakterienentwicklung ist. Es wurde daraufhin das in Abschnitt 11. bereits genannte A-Medium zusammengestellt, wobei neben eigenen Erfahrungen auch Hinweise aus der Literatur berücksichtigt wurden (BECKER, 1974; BLAIR et al.,

1970; DITTRICH, 1973; DREWS, 1974; HINO & WILSON, 1958; HÖLL, 1970; JENSEN, 1961; POCHON, 1954 und 1956; SCHLEGEL, 1965; WENZL, 1934; WERNER et al., 1974).

Das A-Medium wurde mit einer Impföse Schlamm versetzt und aerob und anaerob getestet. Es zeigte sich, daß in allen Fällen eine sehr starke positive Azetylenreduktion auftrat.

Im Nachtrag sei die Zusammensetzung der Spurenelementlösung aufgeführt, die - modifiziert nach DREWS, (1974) - pro Liter A. bidest. folgende Salze enthielt:

MnCl ₂ · 4 H ₂ O:	10 mg,	LiCl:	0,5 mg,
CoCl ₂ :	2 mg,	SnCl ₂ · 2 H ₂ O:	0,5 mg,
CuSO ₄ :	1 mg,	KBr:	2 mg,
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O:	1 mg,	KJ:	2 mg,
ZnCl ₂ :	2 mg,	BaCl ₂ :	0,5 mg,
H ₃ BO ₃ :	1 mg,	pH-Wert:	6,00.

12.2. Untersuchung von ESCHERICHIA COLI und coliformen Keimen auf Stickstofffixierer

Die mit Phosphatpuffer extrahierten und auf Nährkartonscheiben angewachsenen metallisch grünen Kolonien (Abschnitt 2.4.2. und 10.) wurden auf stickstofffixierenden Bakterien untersucht. Die Kolonien wurden jeweils zur Hälfte mit einer Impföse in 10 ml A-Medium (Abschnitt 11.) überführt, 5 Tage bei 30 °C unter leichtem Schütteln anaerob vorbebrütet und nach weiteren 24 h der Azetylenreduktionstest durchgeführt.

Auf der gesamten Nährkartonscheibe waren 104 Kolonien angewachsen. Dies entspricht 10400 ESCHERICHIA COLI und coliformen Keimen pro Gramm Schlamm. Davon wurden 26 Kolonien = ein Viertel der Platte untersucht. Zwei Kolonien zeigten eine stark positive Azetylenreduktion, die übrigen waren negativ. Unterstellt man, daß die Verteilung der Stickstofffixierer auf der gesamten Plattenfläche gleichmäßig war, so ergeben sich insgesamt 8 positive Kolonien. Dies entspricht 7,7% fakultativ

anaerober diazotropher Bakterien an der Gesamtzahl coliformer Keime. Ihre absolute Zahl errechnet sich mit 116 pro Gramm Schlamm, wenn man den gleichen Prozentsatz positiver Proben in Tab. 21 bei den mit Phosphatpuffer extrahierten Coli-Keimen zugrunde legt. Die geringe Anzahl positiver Proben läßt keine statistisch gesicherte Aussage über die tatsächliche Zahl fakultativ anaerober Stickstofffixierer im Schlamm zu. Die hier errechnete Zahl von 116 pro Gramm Schlamm kann daher nur eine annähernde Größenordnung darstellen.

12.3. Untersuchung der "Gesamt-Anaerobier auf Stickstofffixierer

Bei dieser Bestimmung wurden die in Thioglycolat-Bouillon angesetzten Proben weiter untersucht (vergl. Abschnitt 2.4.3. und 10.). Die Untersuchungen basierten auf der Überlegung, daß die letzte trübe Probe der angesetzten Verdünnungsreihen anaerobe Bakterien enthalten muß. Durch abpipettieren steigender Mengen des noch getrübten Thioglycolat-Bouillons sollte die kleinste Menge Probe ermittelt werden, die gerade noch stickstofffixierende Bakterien enthielt, zu erkennen an einer positiven Azetylenreduktion. Hieraus sollte dann das Verhältnis "Gesamt-Anaerobier" zu "stickstofffixierenden Anaerobiern" bestimmt werden.

Von dem letzten trüben Thioglycolat-Bouillon der mit Phosphatpuffer extrahierten Schlammproben wurden 0,1 bis 1,0 ml in 1/10 ml Stufen in 10 ml A-Medium überführt, mit N_2 ausgegast und der Azetylenreduktionstest nach fünftägiger Vorbebrütung durchgeführt.

Keine der untersuchten Proben zeigte eine positive Azetylenreduktion. Dieses negative Ergebnis, mit dem nicht gerechnet worden war, konnte nur untersuchungstechnisch bedingt sein. In der Zusammensetzung des handelsüblichen Thioglycolat-Bouillons ist der Grund für das Scheitern dieser Versuchsserie zu suchen. Im Zuge der Untersuchungen zu den Nährstoffansprüchen

diazotropher Bakterien (Abschnitt 12.1.) war festgestellt worden, daß stickstofffixierende Anaerobier auf das Vorhandensein von 10 g/l Pepton mit einer Senkung der Azetylenreduktionsrate auf etwa die Hälfte im Vergleich zu den peptonfreien Blindproben reagierten. Da der hier verwandte Thioglycolat-Bouillon der Fa. MERCK sogar 15 g/l Pepton enthielt, ist möglicherweise auch die vollständige Hemmung der Azetylenreduktion zu erklären.

12.4. Untersuchung der Koloniezahl auf Stickstofffixierer

Von dem unverdünnten Phosphatpufferextrakt wurden 0,1 und 0,01 ml auf Standardagar (nach "DEV" K 5/2.2), sowie 0,1 ml auf das mit Agar verfestigte A-Medium (siehe Abschnitt 11.) übertragen. Die Bebrütung des Standardagars erfolgte für 48 h bei 37 °C, die des A-Mediums für 72 h bei 30 °C.

Auf dem A-Medium waren 880 Kolonien angewachsen. Davon wurden 28 Kolonien in 10 ml A-Nährlösung übertragen, 5 Tage bei 30 °C aerob bebrütet und nach einem weiteren Tag der Azetylenreduktionstest aerob durchgeführt. Von den 28 Proben zeigte nur 1 eine mäßig starke Azetylenreduktion. Bei gleicher Verteilung müßten auf der gesamten Platte 31 positive Kolonien gewesen sein. Dies entspricht 3,6 % an der Gesamtzahl auf dem A-Medium. Auf dem Standardagar hingegen waren 6300 Kolonien pro ml, entsprechend 630000 Kolonien pro Gramm Schlamm angewachsen. Die Koloniezahlen auf dem A-Medium repräsentieren damit nur 14 % der Gesamtkoloniezahl auf Standardagar. Errechnet man daraus den Prozentsatz aerober Stickstofffixierer an der Koloniezahl, ergeben sich nur 0,005 %. Legt man diesen Prozentsatz positiver Proben bei der Ermittlung der Koloniezahl zu Grunde, so sind bei 295000 Kolonien pro Gramm homogenisiertem Schlamm 15 aerobe Stickstofffixierer zu erwarten. Auch hier gilt die bereits in Abschnitt 12.2. getroffene Einschränkung bezüglich der statistischen Sicherheit der Aussage. Die Feststellung, daß unter den hier gewählten Versuchsbe-

dingungen nur 0,005 % aerobe Stickstofffixierer aus der Koloniezahl ermittelt wurden, ist so zu interpretieren, daß 99,995 % der Proben mit Standardagar und 96,4 % mit A-Medium negativ waren. Die hier mit 15 pro Gramm Schlamm ermittelte geringe Anzahl aerober Stickstofffixierer kann auch aus einem weiteren Grund nur einen ungefähren Anhalt geben. Das Vorhandensein der diazotrophen Aerobier ist auf die aerobe Schlammoberfläche beschränkt. Bei der Probenentnahme wurden jedoch Schlammproben bis zu 15 cm Tiefe ausgehoben und homogenisiert. Damit wurde die natürliche Verteilung der Bakterien verändert.

12.5. Versuch der Reinkultur von stickstofffixierenden Enterobacteriaceen (KLEBSIELLA) in Flüssigkultur

Mit dem A-Medium wurde die Reinkultur stickstofffixierender Enterobacteriaceen versucht. Von den im Quantifizierungstest (Abschnitt 12.2.) positiven Proben wurde eine Impföse Inokulum in neue Nährlösung übertragen, 5 Tage anaerob bei 30 °C bebrütet und anschließend der Azetylenreduktionstest durchgeführt. In keinem Fall wurde eine positive Azetylenreduktion mehr festgestellt, obwohl die Ausgangsproben positiv waren und eine deutliche Trübung der Nährlösung eine Bakterienvermehrung anzeigte. Nach Untersuchungen von WILCOCKSON & WERNER, (1976) sind dafür drei Gründe verantwortlich. Einerseits schädigt die kurzzeitige Berührung mit Luft beim Überimpfen der Proben die Nitrogenase-Aktivität der fakultativen Anaerobier. Dies könnte jedoch von sauerstoffresistenteren Bakterien kompensiert werden, wenn sie nicht in Flüssigkultur gehalten worden wären. Diese hat den entscheidenden Nachteil, daß anaerobe diazotrophe Bakterien nicht die Möglichkeit haben, durch Kolonie- und Schleimbildung im Inneren dieser Bakterienansammlung die für die Stickstofffixierung notwendigen streng anaeroben Verhältnisse zu schaffen. Die Keime liegen so vereinzelt vor und sind ungeschützt dem

trotz Stickstoffausgasung noch spurenhaltig vorhandenen Sauerstoff ausgesetzt, worauf sie zunächst mit dem Einstellen der Azetylenreduktion reagierten. Da der Azetylenreduktionstest hier die einzige analytische Möglichkeit zum Nachweis der Stickstofffixierer war, mussten die Versuche ergebnislos abgebrochen werden. Nach den Untersuchungen der vorgenannten Autoren scheint ein gangbarer Weg die Plattenkultur zu sein, wenn das Nährmedium sehr stark gepuffert wird. Konzentrationen von 0,125 Mol TRIS, bei leicht alkalischen pH-Werten im Nährmedium, haben sich bei *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* als vorteilhaft erwiesen. Auch sollten zur Verfestigung des Nährbodens höchstens 12 g Agar/l verwendet werden, um den Kolonien ein teilweises Eindringen in die mehr gelartige Agarplatte zu ermöglichen. Die Plattenkultur auf C-haltigem, aber stickstofffreiem, stark gepuffertem Medium hat zudem den Vorteil, daß fakultativ anaerobe diazotrophe Bakterien auch aerob getestet werden können. Die Azetylenreduktion sank aerob nur auf rund 50% der anaeroben Reduktionsraten ab (WILCOCKSON & WERNER, 1976).

13. Die Reinkultur fakultativ anaerober diazotropher Bakterien als Plattenkulturen

=====

13.1. Das neue Nährmedium

Im Vordergrund stand die Entwicklung eines Nährmediums für die Reinkultur fakultativ anaerober Stickstofffixierer. Auf die Reinkultur der obligaten Anaerobier musste verzichtet werden, da hierfür das notwendige analytische Gerät nicht zur Verfügung stand, obwohl aus den beschriebenen physiologischen Tests zweifelsfrei zu schließen war, daß im Schlamm des Harkortsees auch obligate Anaerobier (*CLOSTRIDIUM*) vorhanden sind. Ebenso wurde auf die Reinkultur der diazotrophen Aerobier verzichtet, obwohl auch sie vorhanden waren. Auf die Indizien für die beiden letztgenannten Gruppen

wird in der Diskussion (Abschnitt 14.2.) näher eingegangen. Das von WERNER et al., (1975) entwickelte RHIZOBIUM-Medium 20 E - im folgenden nur noch Medium 20 E genannt - wurde nach Angaben von WILCOCKSON & WERNER, (1976) verändert und auf seine Verwendbarkeit bei der Reinkultur freilebender fakultativ anaerober Stickstofffixierer untersucht. Das nitrat- und hefeextrakthaltige, wie auch leicht saure Ausgangsmedium 20 E (vergl. Tab. 24), wurde ohne Nitrate, nur mit 10% des ursprünglichen Hefeextraktgehaltes, mit einer weiteren C-Quelle (hier: Glucose) versehen und zusätzlich mit TRIS gepuffert. Der pH-Wert wurde nach leicht alkalisch verschoben, da die meisten fakultativ anaeroben Stickstofffixierer innerhalb der Enterobacteriaceen Säureproduzenten sind, die bei einem Absinken des pH-Wertes in den sauren Bereich die Stickstofffixierung einstellen. Es wurden folgende drei Varianten des Mediums getestet:

Tab. 24: Untersuchung verschiedener Varianten des RHIZOBIUM-Mediums 20 E (WERNER et al., 1975) auf ihre Verwendbarkeit bei der Reinkultur freilebender fakultativ anaerober Stickstofffixierer.

Ausgangsmedium 20 E	Variante 20 E I	Variante 20 E II	Variante 20 E III
in 1000 ml Medium (angestellt mit A. bidest.) sind enthalten:			
KH_2PO_4	68 mg	68 mg	68 mg
K_2HPO_4	87 mg	87 mg	87 mg
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	370 mg	370 mg	370 mg
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	73,5 mg	73,5 mg	73,5 mg
KNO_3	506 mg	---	20,2 mg
$\text{FeEDTA-Lsg.}^{1)}$	1 ml	1 ml	1 ml
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	4,84 mg	4,84 mg	4,84 mg
Glycerin	4,60 g	4,60 g	4,60 g
Harnit	1,82 g	1,82 g	1,82 g
Hefeextrakt	2,00 g	---	200 mg
Glucose	---	3,56 g	3,56 g
TRIS	---	15,14 g (=0,125 M)	15,14 g (=0,100 M)
Agar-Agar	12,0 g	12,0 g	12,0 g
pH-Wert	6,60	7,25	7,50
	eingestellt	eingestellt	eingestellt

¹⁾ 6,95 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ + 950 mg VITRIPLAK III (= Äthylendinitrilotetraessigsäure-Diantriumsals) in 90 ml A. bidest. aufkochen, nach dem Erkalten auf 100 ml auffüllen.

Die Nährmedien 20 E I - III wurden nacheinander mit gleichen Ausgangsproben fakultativ anaerober Stickstofffixierer getestet. Das Medium 20 E I wurde nach den in den Abschnitten 2.4.2. und 12.2. beschriebenen Verfahren mit coliformen Keimen beimpft und in der gewohnten Weise nach fünftägiger Vorbebrütung der Azetylenreduktionstest anaerob durchgeführt.

Von den insgesamt 30 Kolonien zeigten drei eine stark positive Azetylenreduktion (= 10%). Das Wachstum der Kolonien war schwach, ihr Aussehen schleimig glänzend. Je eine Impföse der positiven Proben wurde auf einer Agarplatte aus Medium 20 E I ausgestrichen und drei Tage weiterbebrütet. Von diesen Platten wurden je 5 Einzelkolonien wieder in Testgefäße mit Nährboden überimpft und nach weiteren drei Tagen der Azetylenreduktionstest anaerob durchgeführt. Alle Proben waren abermals sehr stark positiv, ihr Wachstum mäßig. Damit erwies sich das Nährmedium 20 E I als brauchbar für die Kultivierung freilebender fakultativ anaerober Stickstofffixierer. Es war keine nachteilige Beeinflussung der Azetylenreduktion erkennbar.

Die Variante 20 E II, von der vorigen unterschieden durch Zugaben von 200 mg Hefeextrakt, ihren Gehalt an gebundenem Stickstoff und schwächerer Pufferung, wurde mit den positiven Proben des zweiten Ausstriches aus dem vorangegangenen Test beimpft und in der bereits beschriebenen Weise weiterbehandelt. Alle Proben zeigten deutlich verminderte Azetylenreduktionsraten. Sie waren nur noch schwach bis mäßig positiv, nur zwei Proben zeigten eine stärkere Azetylenreduktion. Das Wachstum der Kolonien war jedoch deutlich besser als auf dem stickstofffreien Medium 20 E I. Ähnliche Erfahrungen hatten WILCOXSON & WERNER, (1976) bereits an *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* gemacht.

Das Medium 20 E III unterschied sich von 20 E I nur durch den Gehalt von 100 mg Hefeextrakt. Getestet wurde es mit den positiven Proben aus 20 E I. Auch hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei Medium

20 E II. Die Azetylenreduktion war stark gehemmt, das Wachstum der Kolonien jedoch etwas besser als auf Medium 20 E I. Diese geringen Gehalte von Hefeextrakt führten bei Reinkulturen stickstofffixierender Organismen bereits zu einer merklichen Hemmung der Azetylenreduktion. Die Vorteile des besseren Bakterienwachstums auf den Medien 20 E II und 20 E III wogen im vorliegenden Fall nicht den Nachteil der gehemmten Azetylenreduktion auf. Das verlangsamte Wachstum konnte durch längere Bebrütungszeiten teilweise ausgeglichen werden. Aus diesen Gründen wurden die Reinkulturen der fakultativ anaeroben Stickstofffixierer mit dem Medium 20 E I durchgeführt.

13.2. Die Erstellung der Reinkulturen der Stickstofffixierer

Ein Verfahrensschema zur Gewinnung von Reinkulturen diazotropher Bakterien zeigt die Abb. 25.

1 g des homogenisierten Schlamm-sedimentes wurde auf 100 ml mit Phosphatpuffer pH 6,88, 0,025 M, aufgefüllt und die Bakterien nach dem in Abschnitt 2.4. geschilderten Verfahren extrahiert. 0,05 ml des Eluates wurden auf einer Agarplatte mit Medium 20 E I ausgestrichen und 5 Tage bei 30 °C bebrütet. Je die Hälfte einer Einzelkolonie wurde in zwei Testgefäße überimpft, diese mit einem Wattepfropf verschlossen und weitere 5 Tage aerob bei 30 °C bebrütet. Der Azetylenreduktionstest wurde nach 3 h aerob (Luft) und anaerob (N₂) durchgeführt. Von den positiven Proben wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, indem etwa 1/8 Impföse aus einer Bakterienkolonie in 4,5 ml PO₄-Puffer übertragen wurde. Über drei Verdünnungsschritte wurde die ursprüngliche Zellzahl von etwa 10⁶ auf 10³ Zellen pro ml reduziert. 0,05 ml der letzten Verdünnungsstufe wurden auf einer Agarplatte ausgespatelt und 5 Tage bei 30 °C bebrütet. Die Einzelkolonien wurden je zu 1/3 in zwei Testgefäße, das letzte Drittel auf Schrägagar überimpft.

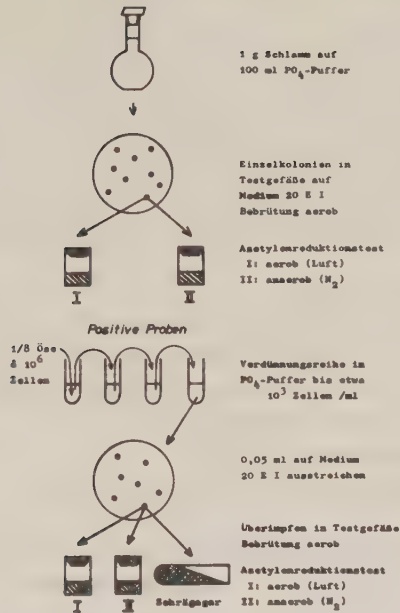


Abb. 25: Schema zur Gewinnung von Reinkulturen stickstofffixierender Bakterien aus Schlammproben.

Nach weiterer fünftägiger Bebrütung wurde in den beiden Testgefäßen der Azetylenreduktionstest aerob und anaerob durchgeführt.

Die Reinkulturen der fakultativ anaeroben Stickstofffixierer verhielten sich auf Medium 20 E I nach einer bestimmten Zeit gegenüber aeroben und anaeroben Testbedingungen sehr verschieden. Etwa die Hälfte der Kulturen zeigte aerob eine stärkere Azetylenreduktion als anaerob. Sie verhielten sich wie echte diazotrophe Aerobier. Die andere Hälfte zeigte - wie erwartet - im anaeroben Milieu die stärkere Azetylenreduktion. Damit können die Befunde von WILCOCKSON & WERNER, (1976) in vollem Umfang bestätigt werden.

13.3. Diagnostizierung der Stickstofffixierer

Die Determination der erstellten Reinkulturen der fakultativ anaeroben diazotrophen Bakterien wurde von Herrn Prof. Dr. MANNHEIM und von Herrn PAPEN im Hygiene-Institut Marburg vorgenommen. Auf die Nachweise und Differenzierungsmerkmale der einzelnen Arten kann hier nicht näher eingegangen werden. Aus den 10 erstellten Reinkulturen wurden folgende Stickstofffixierer ermittelt:

Ord.:	Eubacteriales	Anzahl der Kulturen
Fam.:	Enterobacteriaceae	
	ESCHERICHIA-CITROBACTER-Intermediat	1
	(Atypischer Keim aus der Fam. Enterobacteriaceae)	
	KLEBSIELLA PNEUMONIAE	7
	ENTEROBACTER CLOACAE	1
	ERWINIA spec. (Herbicola-Gruppe)	1

Die im folgenden aufgeführten Charakteristika der Arten wurden aus BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology, (1974) entnommen.

Bei den zu den Enterobacteriaceen gehörenden Arten handelt es sich um gram-negative, nicht sporenbildende, teils begeißelte, teils unbegeißelte, fakultativ anaerobe Bakterien, die vorwiegend im menschlichen und tierischen Darmtrakt vorkommen. Die gesamte Familie ist chemo-organo-troph und von großer biochemischer Aktivität. Wegen fehlender morphologischer Differenzierungen werden zur Bestimmung der Arten das Vorhandensein oder der Ausfall bestimmter biochemischer Leistungen getestet. Bei der Fermentation von Glucose wird vorwiegend Ameisensäure und Wasserstoff gebildet. Die Familie beinhaltet zahlreiche pathogene Formen für Mensch, Tier und Pflanze. Die häufigste Art unter den fakultativ anaeroben N_2 -Fixierern im Schlamm des Harkortsees war KLEBSIELLA PNEUMONIAE. Es ist ein unbegeißeltes stäbchenförmiges Bakterium, etwa $0,3-1,5 \times 0,6-6,0 \mu m$ groß, einzeln, paarweise oder in kurzen Ketten vorkommend, jedes Bakterium von einer deutlichen Schleimhülle umgeben.

Die Kolonien sind kuppelförmig erhoben und glänzend schleimig. Citrat und Glucose können als einzige C-Quelle verwandt werden. Gutes Wachstum der Kolonien erfolgt bei Temperaturen zwischen 35 - 37 °C, der optimale pH-Wert des Nährmediums liegt im leicht alkalischen Bereich bei pH 7,2 (BERGEY's Manual, 1974) und darüber bis pH 8,2 (WILCOCKSON & WERNER, 1976).

Dieses Bakterium, normalerweise ein Bewohner des Darmkanales von Mensch und Tier, kommt weit verstreut in der Natur vor, im Boden, wie auch im Wasser. Unter den drei KLEBSIELLA-Arten (K. PNEUMONIAE, K. OZAENAE und K. RHINOSCLEROMATIS) finden sich Stickstofffixierer nur unter den erstgenannten. Aber auch K. PNEUMONIAE selbst enthält Stämme, die die Stickstofffixierung nicht durchführen können. Nach BURNS & HARDY, (1975) wurde nur bei 13 von 31 untersuchten Stämmen die Stickstofffixierung nach der $^{15}\text{N}_2$ -Methode nachgewiesen.

Eine nah verwandte Art ist das Bakterium ENTEROBACTER CLOACAE. Es sind - im Gegensatz zu KLEBSIELLA - peritrich begeißelte Stäbchen. Auch sie können Citrat und Acetat als einzige C-Quelle verwenden. Bei der Fermentation von Glucose werden auch hier Ameisensäure und die Gase CO_2 und H_2 gebildet. Das Bakterium kommt ebenfalls in den Fäkalien von Mensch und Tier vor. Es wurde darüberhinaus im Abwasser, in abwasserbelasteten Seen und Flüssen, wie auch im Boden nachgewiesen. Seine Fähigkeit zur Stickstofffixierung unter anaeroben Bedingungen wurde erst relativ spät von RAJU et al., (1972) festgestellt. ENTEROBACTER CLOACAE wurde von den vorgenannten Autoren aus der unmittelbaren Rhizosphäre grüner Maispflanzen isoliert. Zwischen den Pflanzenreihen konnte es nicht nachgewiesen werden. Offenbar heftet es sich mit seiner Schleimhülle an die Wurzelhaare der Maispflanzen. Das Bakterium geht aber nur eine lose Assoziation und nicht wie RHIZOBIUM eine echte Symbiose mit der Wirtspflanze ein. In stickstofffreien Medien kam die Azetylenreduktion bei Sauerstoffpartialdrücken $>0,04$ atm gänzlich zum Erliegen.

Dieser Stickstofffixierer könnte demnach auch als "mikroaerophil" bezeichnet werden. Die dort beschriebene starke Schleimproduktion kann hier bestätigt werden.

Die Fähigkeit zur Stickstofffixierung bei ERWINIA ist noch nicht beschrieben und bedarf weiterer Untersuchungen. Die hier später als ERWINIA bestimmte Reinkultur führte nach fünftägiger Anzucht bei 30 °C auf Medium 20 E I nach 6 stündiger Bebrütung mit Azetylen (letzter Schritt in Abb. 25) die Azetylenreduktion aerob nur schwach bis mäßig durch, anaerob (N_2) war sie jedoch sehr stark positiv. Ein neu und länger durchgeführter aerober Test mit der zuvor schon einmal aerob getesteten Subkultur über 22 h verlief völlig negativ. Daraus ist zu schließen, wenn die Stickstofffixierung überhaupt von ERWINIA durchgeführt wird, geschieht dies nur auf einem definierten Medium nach anaerober Anzucht und unter streng anaeroben Testbedingungen. Möglicherweise ist die Stickstofffixierung - wie auch in anderen Fällen schon beschrieben - an die Ausbildung einer Schleimhülle gebunden. Das äußere Aussehen der hiesigen Kultur war milchig weiß. Bei den Zellen handelt es sich um peritrich begeißelte Stäbchen, von 0,5-1,0 x 1,0x3,0 µm Größe. Säure wird bei der Fermentation der verschiedensten Kohlehydrate gebildet, eine Gasproduktion fehlt oder ist sehr schwach. Das Temperaturoptimum liegt zwischen 27 - 30 °C. ERWINIA-Arten der Herbicola-Gruppe kommen als pathogene oder saprophytische Keime auf und in Pflanzen vor. Ihr Vorhandensein im Harkortsee wäre durch Einschwemmen von befallenem Pflanzenmaterial über die Ruhr erklärbar. Die eine Kultur, die aus einem atypischen Keim hervorgegangen ist und als ESCHERICHIA - CITROBACTER - Intermediat bezeichnet wurde, kann nicht näher beschrieben werden. ESCHERICHIA gehört zu den echten Fäkalindikatoren, während CITROBACTER als coliformes Bakterium zwar im Darmkanal von Warmblütern regelmäßig vorkommt, sich darüberhinaus aber auch im freien Wasser

vermehrten kann. Morphologisch sind beide Gattungen gleich. Es handelt sich um gerade, peritrich begeißelte Stäbchen, mit einer Größe zwischen 1,1-1,5 x 2,0-6,0 μ m. Die Kolonien sind schleimig und ganzrandig. Glucose und andere Kohlehydrate werden unter Bildung von Milch- und Ameisensäure fermentiert, letztgenannte weiter zu CO_2 und H_2 abgebaut. Der wesentlichste Unterschied zwischen beiden Gattungen ist, daß *ESCHERICHIA* Acetat, aber nicht Citrat, als einzige C-Quelle benutzen kann, wohingegen *CITROBACTER* auch Citrat (daher der Name) als ausschließliche C-Quelle verwenden kann.

Interessante Aspekte in diesem Zusammenhang liefert die von HEIL, (1973) beschriebene Übertragung des nif-Operons von *KLEBSIELLA* auf *ESCHERICHIA COLI* durch Konjugation.

E. COLI, das normalerweise N_2 nicht fixieren kann, erlangte diese Fähigkeit durch den Gentransfer. Vielleicht erlangen durch Gentransfer neue Bakterienstämme die Fähigkeit zur Stickstofffixierung, die sie bisher nicht durchführen konnten.

14. Zusammenfassung und Diskussion

14.1. Zusammenfassung

Der im Mittellauf der Ruhr gelegene Harkortsee dient als Flußkläranlage zur Reinhaltung der Ruhr (Abb. 5). Mit seinem natürlichen Schlammsediment wurden neben chemischen und bakteriologischen auch physiologische Untersuchungen zur Stickstofffixierung mittels Azetylenreduktionstest durchgeführt. Der Harkortsee ist ein typisch eutropher See. Seine biologische Besiedlung und damit der Saprobienindex zeigten einen charakteristischen Jahresgang (Tab. 7, Abb. 9). Das Sediment im Harkortsee ist ein anaerober Faulschlamm mit hohen Anteilen organischer Substanz (Tab. 3 und 5). Bei den vorgefundenen natürlichen Ammoniumkonzentrationen im Schlamm bis 265 mg/kg (= 14,7 mMol) wurde eine positiv lineare Abhängigkeit der Azetylenreduktion vom Ammoniumgehalt festgestellt (Tab. 3 und 4, Abb. 6 und 7). Die Richtigkeit der Annahme einer linearen Regreßion zwischen Ammoniumgehalt und Azetylenreduktionsrate wurde mathematisch nachgewiesen (Abschnitt 3.2.). Darüberhinaus bestand noch eine positiv lineare Beziehung zwischen Ammoniumgehalt und organisch gebundenem Stickstoff (Tab. 6). Es wurden systematische Untersuchungen zur Abhängigkeit der Azetylenreduktion von höheren Ammonium- und Nitratgehalten durchgeführt. Nitrat war im Schlamm nicht nachweisbar. Bei Gehalten bis zu 80 mMol NH_4^+ /kg war eine deutliche Erhöhung der Azetylenreduktion gegenüber den nicht behandelten Blindproben festzustellen. Bei 20 mMol NH_4^+ /kg traten die höchsten Reduktionsraten auf (Abb. 20, Tab. 13). Über 80 mMol NH_4^+ /kg hinausgehende Ammoniumzugaben bewirkten eine stetige Verlangsamung der Azetylenreduktion, bis auf 15% des Maximalwertes bei 500 mMol NH_4^+ /kg. Ab dieser Konzentration kam die biologische Stickstofffixierung praktisch zum Erliegen. Bei Nitratzugaben konnte nur im Spurenbereich bis 0,1 mMol NO_3^- /kg eine Förderung der

Azetylenreduktion, ab 0,2 bis 5 mMol eine zunehmende Hemmung, ab 10 mMol NO_3^-/kg der völlige Ausfall der Stickstofffixierung festgestellt werden (Abb. 21, Tab. 16). Gegen Nitrate erwies sich die diazotrophe Bakterienfauna im Schlamm etwa 100 mal empfindlicher als gegen Ammoniumverbindungen.

Das Temperaturoptimum der biologischen Stickstofffixierung im hier untersuchten Schlammsediment wurde mit 28 °C ermittelt, dabei eine lineare Zunahme der Azetylenreduktion im Bereich von 0 °C bis 25 °C festgestellt (Abb. 16 und 17, Tab. 9). Die " Q_{10} -Regel" wurde experimentell bestätigt (Abb. 17). Die chemischen Azetylenreduktionsraten steriler Schlammproben stiegen ebenfalls mit der Inkubationstemperatur an (Abb. 18, Tab. 10). Im optimalen Bereich der biologischen Stickstofffixierung hatten sie aber keine Bedeutung.

Die anaerobe Azetylenreduktion bei 25 °C zeigte einen charakteristischen Zeitverlauf (Abb. 19, Tab. 12). Sie war am höchsten während der ersten 24 h und sank auf 56%, 44% und 30% des Ausgangswertes am 2., 3. und 4. Inkubationstag ab. Dies war auf ein teilweises Absterben der diazotrophen Bakterienfauna zurückzuführen. Nach dem 4. Tag stiegen die Reduktionsraten wieder an und erreichten nach rund 8 Tagen einen konstanten Wert um 100 nMol $\text{C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$. Dies wurde auf Adaptation der überlebenden Bakterien an das C_2H_2 -haltige Substrat mit einer nach 4 Tagen einsetzenden Zellvermehrung zurückgeführt (Abschnitt 4.4.).

Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck zeigte eine Dreiteilung (Abb. 22, Tab. 17). Es wurde eine Hemmung der Nitrogenase-Aktivität bei fakultativen und obligaten Anaerobiern durch pO_2 von 0,02 bis 0,10 atm und die Förderung der Aerobier im Bereich von 0,12 bis 0,20 atm O_2 festgestellt. Hier traten sehr hohe Reduktionsraten bis zu 2100 nMol $\text{C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ auf. Eine nennenswerte Azetylenreduktion wurde auch noch bei pO_2 von 0,20 bis 0,40 atm ermittelt. Selbst unter reiner Sauerstoffatmosphäre

wurde sie noch in bescheidenem Umfang durchgeführt. Die anaerobe Stickstofffixierung blieb während des ganzen Jahres fast konstant, während die aerobe Stickstofffixierung einem deutlichen Jahresgang unterworfen war (Abb. 23). Von April bis September lag sie unter den anaeroben Stickstofffixierungsraten, ein starker Anstieg auf das fünf- bis sechsfache war im November und Dezember feststellbar, danach sanken sie wieder langsam ab und erreichten im April ihren sommerlichen Niedrigstand. Die festgestellten aeroben Azetylenreduktionsraten bis zu $2100 \text{ nMol C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ (s.o.) waren biogenen Ursprungs. Dies wurde durch Zugaben der Antibiotika NEOMYCIN, STREPTOMYCIN und PENICILLIN und der einhergehenden Hemmung der Azetylenreduktion festgestellt (Abb. 24, Tab. 18 und 19).

Zur Berechnung der bakteriellen Stickstofffixierung im Harkortsee wurde der Umrechnungsfaktor $\text{C}_2\text{H}_4 / 2 \text{ NH}_3$ experimentell mit 4,2 bestimmt (Abschnitt 2.1.).

Die durch Bakterien und Blaualgen im Harkortssee fixierte Stickstoffmenge wurde mit 12,5 Jahrestonnen errechnet, dies sind 0,70% der jährlichen natürlichen Stickstofffracht der Ruhr (Tab. 20). Die Verluste durch Denitrifikation betrugen 163 t. Dies waren 6,84% der dem See insgesamt zufließenden Stickstoffmenge, aber 13 mal mehr als die biologische Stickstofffixierung.

Vier Elutionsmittel zur Extraktion diazotropher Bakterien aus dem Schlamm und ihr Einfluß auf den Azetylenreduktionstest wurden miteinander verglichen (Tab. 22). Physiologische Kochsalzlösung und A. dest. waren zur Anreicherung der N_2 -Fixierer nicht geeignet, weil keine Azetylenreduktion stattfand. TRIS-Puffer pH 7,20, 0,05 M, war bedingt einsetzbar, die besten Ergebnisse wurden mit Phosphatpuffer pH 6,88, 0,025 M, erzielt. Die höchsten Koloniezahlen im Schlamm wurden mit TRIS-Puffer, die höchsten Coli- und Anaerobierzahlen hingegen mit Phosphatpuffer erzielt. Die Gesamtmittelwerte pro Gramm Schlamm betrugen (Tab. 21):

- a) Koloniezahl: 295000;
b) *ESCHERICHIA COLI* und coliforme Keime: 1100;
c) fakultative und obligate Anaerobier: 344000.

Eine Quantifizierung der Stickstofffixierer an den ermittelten Keimzahlen wurde vorgenommen.

- zu a) Der Prozentsatz der aeroben N_2 -Fixierer an der Koloniezahl betrug 0,005%. Dies bedeutet eine absolute Zahl von rund 15 pro Gramm homogenisiertem Schlamm (Abschnitt 12.4.).
zu b) Bei den coliformen Keimen lag der Prozentsatz der fakultativ anaeroben Stickstofffixierer zwischen 7,7 und 10%. Bei einer Gesamtzahl von 1100 Keimen errechnet sich ihre absolute Zahl mit rund 100 pro Gramm Schlamm (Abschnitt 12.2.).
zu c) Mit PO_4 -Puffer waren pro Gramm Schlamm zwischen 500 und 1000 fakultativ und obligat anaerobe Stickstofffixierer analytisch nachweisbar. An der Anzahl "Gesamt-Anaerobier" waren dies 0,3% (Abschnitt 11.).

Die Nährstoffansprüche der Stickstofffixierer wurden untersucht (Tab. 23) und ein neues Medium zur Erstellung von Reinkulturen fakultativ anaerober diazotropher Bakterien entwickelt (Tab. 24). Die Diagnostizierung von 10 erstellten Reinkulturen ergab folgende fakultativ anaerobe Stickstofffixierer (Abschnitt 13.3.):

- 7 x *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*,
1 x *ENTEROBACTER CLOACAE*,
1 x *ERWINIA* spec. (hier bedarf der gesicherte Nachweis der N_2 -Fixierung weiterer Untersuchungen),
1 x *ESCHERICHIA-CITROBACTER*-Intermediat
(Atypischer Keim aus der Fam. Enterobacteriaceae).

Aufgrund der durchgeführten physiologischen Experimente ist auch das Vorhandensein von *AZOTOBACTER*-Arten (aerob), wie auch von Clostridien (obligat anaerob) als sicher anzunehmen.

14.2. Diskussion

Der positiv lineare Zusammenhang von Ammoniumgehalt des Schlammes und seiner Azetylenreduktionsrate hat bedeutende biologisch-ökologische Folgen. Unsere Seen und Flüsse nehmen u.a. zahlreiche Einleitungen gereinigter und ungereinigter häuslicher Abwässer mit hohen Gehalten an Ammonium und anderen organisch gebundenen Stickstoffverbindungen auf. Die Ammoniumkonzentrationen im Zulauf einer Kläranlage werden bei der Passage einer vollbiologisch gut arbeitenden Anlage nur zu etwa $1/3$ eliminiert. Die absoluten Konzentrationen im Ablauf liegen erfahrungsgemäß zwischen 20 - 50 mg NH_4^+ /l und hängen vom Typ der Anlage, der Auslastung und dem Fremdwasseranteil ab. Die Oxidation des NH_4^+ zum NO_3^- ist unvollständig, so daß die Ammoniumbelastung unterhalb dieser Einleitungsstellen in jedem Falle mäßig bis stark ansteigt. Dies hat aber, wie dargelegt wurde zur Folge, daß auch die bakterielle Stickstofffixierung linear zunimmt. So werden durch diese Fixierungstätigkeit zusätzlich noch steigende Mengen Ammonium in die Gewässer eingebracht. Da mit steigendem Ammoniumgehalt auch der organisch gebundene Stickstoff zunimmt muß man annehmen, daß auch die Bakterienzahl aufgrund des höheren Nährstoffangebotes zugenommen hat. Daß es durch die geschilderten Prozesse nicht zu einem ständigen Anstieg der Ammoniumkonzentrationen kommt, dafür sorgt einerseits die im aeroben Milieu ablaufende Nitrifikation des Ammoniaks, andererseits die anaerob durchgeführte Denitrifikation. Zunächst wird jedoch ein starkes Eutrophierungspotential in die Gewässer eingebracht. Dieser "circulus viciosus" kann nur dadurch durchbrochen werden, daß der anthropogene Eintrag von Ammonium in die Gewässer weitgehend verhindert wird, um die zusätzliche Ankurbelung der Stickstofffixierung herabzusetzen, bzw. weitgehend zu vermeiden. Ein gangbarer Weg scheint die völlige Mineralisation des NH_4^+ zum NO_3^- zu sein, dies würde zu der beschriebenen Hemmung der N_2 -Fixierung bei höheren Nitratgehalten führen.

Ein weitergehender Schritt wäre die systematische Steuerung der Denitrifikation. Die Entfernung des Stickstoffs aus dem Abwasser ist neben der Phosphatelimination eine der Möglichkeiten, der Eutrophierung eines Gewässers entgegenzuwirken. Die Entfernung muß dort systematisch betrieben werden, wo im Gewässer ablaufende Nitrifikationsvorgänge zu einer kritischen Belastung des Sauerstoffhaushaltes führen. So werden bei der Oxidation von $1 \text{ mg NH}_3/\text{l}$ zu Nitrat rund $4,3 \text{ mg/l}$ Sauerstoff benötigt. Die Überlegungen zur gesteuerten Denitrifikation sind bisher überwiegend auf den Abwassersektor bezogen worden, da hier im allgemeinen mit hohen Stickstoffkonzentrationen zu rechnen ist. Voraussetzung für eine gesteuerte Denitrifikation sind die nitrifizierenden Stufen einer biologischen Kläranlage. Hierbei ist anzumerken, daß die Nitrifikation bisher in den Kläranlagen nur unvollständig durchgeführt werden kann, weil man sich aus Wirtschaftlichkeitsgründen auf eine Raumbelastung von $0,5 \text{ kg BSB}_5/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ beschränkt hat. Demgegenüber wurde von der ATV, (1976) inzwischen nachgewiesen, daß erst bei einer Raumbelastung von $\leq 0,2 \text{ kg BSB}_5/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ die Oxidation des Ammoniums zum Nitrat fast vollständig verläuft. Da während der Nitrifikation der vorhandene organische Kohlenstoff aufgezehrt wird, muß er für die Denitrifikation erneut zugeführt werden. Neben der Zudosierung von organischen C-Verbindungen (Methanol, Glucose) im experimentellen halbtechnischen Betrieb, hat sich in der Klärwerkspraxis die Zugabe von Belebtschlamm bewährt, wenn auch hierbei die Stickstoffeliminierungsrate nur bis zu 80% der theoretisch möglichen Menge gebracht werden konnte (PÖPPINGHAUS, 1975). Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß keine zusätzlichen Betriebskosten entstehen. Die organischen Kohlenstoffverbindungen liefern die für die Denitrifikation erforderlichen Reduktionsmittel, wobei das Nitrat zum atmosphärischen Stickstoff bzw. zu N_2O dissimiliert wird und ausgast, sie selbst werden zu CO_2 und H_2O oxidiert. Verfahrenstechnisch läuft der Vorgang so ab,

daß das aus der biologischen Stufe der Kläranlage ablaufende nitrifizierte Abwasser in einem weiteren Reaktionsbecken unter Belebtschlammzugabe nur so weit belüftet wird, daß einerseits die Schlammflocken gerade in der Schwebelage gehalten werden und gleichmäßig verteilt sind, andererseits sich aber keine aeroben Verhältnisse einstellen. Bereits bei Gehalten von $0,10 \text{ mg O}_2/\text{l}$ sinkt die Nitratreduktion auf 90 % des möglichen Wertes ab. Das bedeutet, daß die Denitrifikation in der engen Banbreite zwischen Oxidation und Reduktion gesteuert werden muß. Aber auch im Hinblick auf die Trinkwasserversorgung kann die Denitrifikation möglicherweise noch Bedeutung erlangen. Da in steigendem Maße Oberflächenwasser mittelbar wie unmittelbar zur Trinkwassergewinnung herangezogen wird, muß die Stickstoffeliminierung besonders dort betrieben werden, wo zu hohe Nitratkonzentrationen die Nutzung als Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung bedenklich erscheinen lassen. In solchen Fällen wird man prüfen müssen und das besonders dann, wenn mangels anderen Wasserdargebotes auf diese nitrathaltigen Wasservorkommen zurückgegriffen werden muß, ob eine Denitrifikation als Voraussetzung für die Wasseraufbereitung hier Abhilfe schaffen kann.

Die hier festgestellten positiv linearen Beziehungen zwischen der anaeroben Azetylenreduktion einerseits, sowie dem Ammoniumgehalt und dem organisch gebundenen Stickstoff im Schlamm andererseits, könnten praktische analytische Bedeutung erlangen, wenn sich die hier gewonnenen Erkenntnisse an anderen Sedimenten bestätigen lassen. Die Kjeldahl-Destillation eines Schlammes zur Bestimmung des Ammoniumgehaltes und des Gehaltes an organisch gebundenem Stickstoff ist ein aufwendiges und zeitraubendes Verfahren mit relativ großer Standardabweichung, die hier experimentell mit rund 10 % ermittelt wurde. Stattdessen könnte mit hinreichender Genauigkeit aus der Größe der anaeroben Azetylenreduktion auf den Ammoniumgehalt des Schlammes und seinen Gehalt an organisch gebundenem Stickstoff geschlossen werden. Für ver-

schiedene Probenentnahmestellen eines Biotops werden Ammoniumgehalt, der organisch gebundene Stickstoff und die Azetylenreduktionsraten bestimmt. Aus den Meßpunkten werden in Abhängigkeit von der Azetylenreduktion für den Ammoniumgehalt sowie für den organisch gebundenen Stickstoff getrennt die idealen Regreßionsgleichungen ermittelt, die als Eichgeraden für die Bestimmung dieser beiden Größen aus der Anzahl der gebildeten $\text{nMol C}_2\text{H}_4/\text{kg}$ dienen können. Die Inkubationstemperatur sollte 28°C betragen, die Äthylenbestimmung nach 72 h erfolgen. Das Verfahren bietet sich in den Fällen an, wo in relativ kurzer Zeit in einem Schlamm-sediment eine große Anzahl von Ammoniumbestimmungen und/oder gleichzeitige Ermittlungen des organisch gebundenen Stickstoffs durchgeführt werden müßten. Im Gegensatz zum Ammonium-Ion ist der Wirkungsmechanismus des Nitrat-Ions auf die Nitrogenase noch nicht völlig geklärt. Eine Hemmung der Stickstofffixierung wurde indes von verschiedenen Autoren bei nitrathaltigen Kulturen nachgewiesen. WILSON et al., (1943) wiesen für AZOTOBACTER VINELANDII nach, daß bei Gehalten von etwa 100 ppm die Stickstofffixierung fast gänzlich zum Erliegen kam. BONE, (1971) wies für die Blaualge ANABAENA FLOS-AQUAE in Reinkultur bei Konzentrationen von $1,5 \text{ mMol NO}_3^-/\text{l}$ eine Nitrogenase-Hemmung um den Faktor 4 - 6 im Vergleich zu den nitratfreien Blindproben nach. Bei höheren Nitratkonzentrationen sank die Nitrogenase-Aktivität sogar auf 5 - 10 % des Wertes der Blindproben ab. SORGER, (1969) wies wiederum für AZOTOBACTER VINELANDII bei Nitratgehalten zwischen 4,2 und 5,6 mMol eine Nitrogenase-Hemmung von 50 % nach. Dem Ammonium-Ion als Endprodukt der biologischen Stickstofffixierung kommt eine zentrale regulatorische Bedeutung zu. Nitrate werden durch Nitrat- und Nitritreduktase zum Ammonium reduziert. Die allgemein festgestellte höhere Empfindlichkeit der stickstofffixierenden Organismen gegen Nitrate, gemessen als Hemmung der Stickstofffixierungstätigkeit, wird auf eine "Nitratpermease" in den Zellwänden zurückgeführt,

die das Nitrat in den Zellen anreichert und in Kontakt mit dem stickstofffixierenden Apparat bringt (SORGER, 1969). Vergleicht man die Ergebnisse von SORGER, (1969) mit den hier gewonnenen Erkenntnissen, können diese in vollem Umfang bestätigt werden, wenn es sich im vorliegenden Fall auch um ein natürliches Schlamm sediment und nicht um eine Reinkultur stickstofffixierender Organismen handelt. Hier sank die Azetylenreduktion bei Nitratkonzentrationen um 5 mMol sogar auf 44 % des Ausgangswertes der nitratfreien Blindproben ab. Gegen Nitrate war das Schlamm sediment mit seinen Stickstofffixierern im Harkortsee etwa 100 mal empfindlicher als gegen Ammoniumverbindungen.

Systematische Untersuchungen zur Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate eines biologisch aktiven Schlammes von der Inkubationstemperatur fehlen. GOERING & NEESS, (1964) stellten an zwei Seen (lake Mendota und lake Wingra) im Staat Wisconsin (USA) eine direkte lineare Abhängigkeit der Stickstofffixierungsrate von der Inkubationstemperatur fest. Von 16 - 30 °C stieg sie linear an. Die Bestimmung erfolgte nach der ¹⁵N-Methode und die Untersuchungen wurden an stickstofffixierenden Blaualgen durchgeführt. Die Ergebnisse sind demnach nicht direkt mit den hier dargestellten vergleichbar. HARDY et al., (1968) wiesen an Sojabohnenknöllchen einen Anstieg der Reduktionsraten zwischen 10 - 20 °C nach, das Maximum lag zwischen 20 - 30 °C. Oberhalb von 30 °C setzte eine Verlangsamung der Reduktionstätigkeit ein. Andere Autoren, DART & DAY, (1971) erhielten für andere Leguminosenknöllchen ähnliche Ergebnisse, wenn auch mit leicht differierenden Temperaturoptima und -maxima. Obwohl keine direkt vergleichbaren Untersuchungen vorliegen, stimmen doch die Befunde weitgehend überein. Bei stickstofffixierenden Blaualgen, Nitrogenase-Extrakten aus AZOTOBACTER- und Clostridien-Zellen, Leguminosenknöllchen und in der vorliegenden Arbeit auch bei einem natürlichen Schlamm sediment, wurde eine direkte Abhängigkeit der Azetylenreduktion von der Inku-

bationstemperatur festgestellt. Sie steigt linear mit der Temperatur von 0 bis knapp unter 30 °C an und fällt in allen Fällen über 30 °C wieder ab. Die Temperatur-optima liegen zwischen 25 - 28 °C und hängen vom untersuchten System bzw. Organismus ab.

Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Stickstoff-fixierung vom Sauerstoffpartialdruck lassen die Frage nach der Entstehung und Weiterentwicklung der Stickstofffixierung aufkommen. Die Problematik soll kurz entwicklungsgeschichtlich dargestellt werden. Es wird übereinstimmend davon ausgegangen, daß die Uratmosphäre der Erde reduzierende Eigenschaften hatte und vorwiegend aus CH_4 , NH_3 und H_2O bestand, daneben aber auch in geringem Maße H_2 , N_2 , H_2S , CO und CO_2 enthielt. Dabei war molekularer Sauerstoff im Anfang nur in Spuren vorhanden, gebildet durch Photolyse des Wassers. Der Sauerstoff ging aber sofort Reaktionen mit dem großen Angebot reduzierender Substanzen ein und wurde damit chemisch gebunden. Nicht zuletzt durch diese Reaktionen entstand eine unübersehbare Anzahl neuer Moleküle. Die ersten "echten Lebewesen" müssen zweifelsfrei einfache anaerobe Organismen gewesen sein, deren Stoffwechselumsetzungen durch das zur Verfügung stehende Nahrungsangebot gesteuert wurde. Ammonium war unter den Stickstoffverbindungen wohl das bevorzugt aufgenommene Ion. Solange es in ausreichendem Maße frei zur Verfügung stand, brachte die Möglichkeit zur Stickstofffixierung keinen selektiven Vorteil. Mit steigendem O_2 -Gehalt der Atmosphäre setzte aber die Nitrifikation des Ammoniums ein, wobei Nitrat auf Kosten von Ammonium gebildet wurde. Dieses Nitrat wurde aber an anaeroben Stellen durch Denitrifikation zum molekularen Stickstoff reduziert, so daß es zu einer ernsten Verknappung von gebundenen Stickstoffverbindungen - sowohl Ammonium, wie Nitrat - im Verlauf der Zeit gekommen ist, gefolgt von einer Anreicherung des gasförmigen Stickstoffs in der Atmosphäre. An diesem Wendepunkt muß die anaerobe Stickstofffixierung "erfunden"

worden sein. Nach BURNS & HARDY, (1975) ist der Anfang der Stickstofffixierung bei photoautotrophen Verwandten der heute noch lebenden grünen Schwefelbakterien zu suchen. Von diesen "Urahnen" wird die phyllogenetische Entwicklung der anderen photosynthetischen Schwefelbakterien und möglicherweise auch der Blaualgen abgeleitet. Die Clostridien können sich aufgrund ihrer komplexen organischen Nährstoffansprüche erst nach den photoautotrophen stickstofffixierenden Bakterien entwickelt haben. Das letzte Glied in dieser Kette sind die aeroben Stickstofffixierer vertreten durch AZOTO-BACTER. Daß diese Entwicklungsreihe nicht willkürlich angenommen wurde zeigt die Tatsache, daß die überwiegende Mehrzahl der Stickstofffixierer zu den fakultativen und obligaten Anaerobiern gehört und daß sie schon vorhanden gewesen sein müssen beim Übergang von einer reduzierenden zur oxidierenden Uratmosphäre. Auch die Sauerstoffempfindlichkeit der Nitrogenase spricht für ihr Entstehen unter reduzierenden atmosphärischen Bedingungen. Daneben besitzen die meisten, wenn nicht gar alle photosynthetisch aktiven Bakterien die Fähigkeit zur Stickstofffixierung. BURNS & HARDY, (1975) vermuten, daß aufgrund des einheitlichen Baues der Nitrogenase und ihrer einheitlichen Reaktionen die Fähigkeit zur N_2 -Fixierung ursprünglich alle Prokaryonten besessen haben, diese Fähigkeit aber bei vielen Organismen im Verlauf der Zeit wieder verlorengegangen ist, als ein gewisser Grundstock fixierter Stickstoffverbindungen vorhanden war. Darüberhinaus mussten die diazotrophen Aerobier erst einen Mechanismus "erfinden", um ihre Nitrogenase vor dem Sauerstoffangriff und der damit verbundenen Inaktivierung zu schützen. Möglicherweise haben viele Bakterien in dem Augenblick die Fähigkeit zur Stickstofffixierung verloren, als durch das Auftreten grüner Pflanzen ein rascher Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes eintrat und sie nicht schnell genug ihr Enzym schützen konnten. Daß zahlreiche fakultativ und obligat anaerobe Stickstofffixierer in der heutigen

oxidierenden Atmosphäre dennoch gute Lebensbedingungen finden liegt daran, daß sie Lebensräume besiedeln, in denen die Sauerstoffberührung weitgehend oder völlig verhindert wird. Dies kann durch Schlammpartikel geschehen oder durch Schleimhüllen, die eine O_2 -Diffusion verhindern oder erschweren. Auch eine dichte Ansammlung von Bakterien, eine Kolonie, kann in ihrem Inneren durch Erhöhung der Atmungsrate anaerobe Verhältnisse schaffen. Bei organisch hochbelasteten Schlämmen, wie im vorliegenden Fall, wird der Sauerstoff durch oxidative Abbauprozesse verbraucht. Eine große Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang auch den stickstofffixierenden Symbiosen zu. Sie beruhen fast alle darauf, daß einerseits der Wirt den Stickstofffixierer mit notwendigen Kohlenstoffverbindungen versorgt, weil sie fast alle C-heterotroph sind, und dieser dafür seinem Wirt Stickstoffverbindungen zuführt, andererseits vermindert der Wirt den Sauerstoffpartialdruck oder sorgt gar für seine Eliminierung, denn auch die aeroben Stickstofffixierer entfalten ihre maximale Aktivität ja erst bei Sauerstoffpartialdrücken, die niedriger sind als in der Atmosphäre. Die Symbiose von Wirtspflanze und Bakterium bzw. Blaualge kann sehr lose sein, wie es beispielsweise bei Flechten der Fall ist. Auch nicht näher definierte Lebensgemeinschaften von stickstofffixierenden und nicht stickstofffixierenden Bakterien haben neben der Versorgung des Stickstofffixierers mit Nährstoffen die Herabsetzung des Sauerstoffpartialdruckes zur Folge. Solche Lebensgemeinschaften sind experimentell nachgewiesen worden für RHODOPSEUDOMONAS CAPSULATA mit BACILLUS MEGATERIUM. Eine Steigerung der Stickstofffixierungsrate ist auch für die Gemeinschaft AZOTOBACTER/PSEUDOMONAS nachgewiesen worden. Eine weitergehende Abhängigkeit voneinander ist in den Symbiosen mit bestimmter morphologischer Ausprägung zu suchen. Hier sind die Blattknöllchen-Symbiosen von KLEBSIELLA mit der tropischen Pflanze PSYCHOTRIA zu nennen. Diese

Knöllchen werden aus subepidermalen Schichten gebildet und verhindern weitgehend den Sauerstoffzutritt zu dem fakultativ anaeroben Stickstofffixierer. Ähnliche Symbiosen sind auch mit Blaualgen bekannt. Hier seien aufgeführt: NOSTOC mit den Moosen BLASIA und CAVICULARIA (Blattunterseite), ANABAENA mit dem Wasserfarn AZOLLA (Blattporen), sowie NOSTOC mit GUNNERA (Warzen an der Blattbasis). Zahlreiche tropische Cycadaceen bilden Symbiosen mit den Blaualgen ANABAENA und NOSTOC. Die letzte Stufe dieser Symbiosen wird eingenommen von der obligaten Lebensgemeinschaft der Leguminosen mit dem Knöllchenbakterium RHIZOBIUM.

Zum Schluß soll noch auf ein anderes von BURNS & HARDY, (1975), wie auch von SILVER & POSTGATE, (1973) vorgeschlagenes Modell zur Entstehung der Stickstofffixierung hingewiesen werden. Dies geht nicht entwicklungsge-schichtlich vor, sondern von der Tatsache aus, daß die Nitrogenase auch andere Substrate als N_2 reduzieren kann. Wenn diese Substrate mit möglichen Bestandteilen des Urmeeres und der Uratmosphäre verglichen werden zeigt sich, daß Nitrile und Cyanide auch damals vorhanden gewesen sein müssen. Es ist deshalb nicht von der Hand zu weisen, daß Nitrogenase "erfunden" wurde, um diese Stoffe reduktiv zu entgiften, bzw. mit Dreifachbin-dungen Reaktionen einzugehen. Das Verschwinden der Subs-trate, deren Vorhandensein das Enzym Nitrogenase her-vorgebracht haben, ging einher mit dem Anstieg gasför-migen Stickstoffs, so daß die Stickstofffixierung im Prinzip nur einen Substratwechsel für ein vorhandenes Enzym darstellte.

Neben den hier bestimmten Reinkulturen fakultativ an-aerober Stickstofffixierer müssen im Schlamm des Harkort-sees auch Aerobier aus der Fam. Azotobacteriaceae, wie auch obligate Anaerobier aus der Fam. Bacillaceae vor-handen sein. Hierfür sprechen Ergebnisse aus den durch-geführten physiologischen Untersuchungen. Die typische Dreiteilung bei den Untersuchungen zur "Abhängigkeit der Azetylenreduktion vom Sauerstoffpartialdruck" (Abschnitt

7., Abb. 22) mit sehr hohen Azetylenreduktionsraten nach einer zweitägigen Vermehrungsphase bei dem für AZOTOBACTER-Arten optimalen pO_2 von 0,12 bis 0,20 atm, ein Befund, der sich mit gleichartigen Untersuchungen an Reinkulturen völlig deckt, läßt den Schluß zu, daß diese aeroben Stickstofffixierer an der Schlammoberfläche vorhanden sind. Daß die hier ermittelten hohen Azetylenreduktionsraten biogenen Ursprungs waren, wurde durch Zugaben von Antibiotika festgestellt. Im Quantifizierungstest ergab sich ja auch eine aerobe Stickstofffixiererzahl von 15 Keimen pro Gramm Schlamm. Die Erstellung von Reinkulturen aus dem Schlammextrakt wäre aufgrund dieser geringen Zahl nur durch spezielle Anzucht und Vermehrung möglich gewesen. Bei den Bakterien der Gattung AZOTOBACTER handelt es sich um relativ große (2 μ m), stäbchen- bis kokkenförmige, gram-negative, peritrich begeißelte Formen. Sie sind C-heterotroph und fixieren etwa 10 mg atmosphärischen Stickstoffs pro Gramm verbrauchter Kohlehydrate. Sie sind zu starker Schleimproduktion befähigt. Die verbreitetsten AZOTOBACTER-Arten sind A. VINELANDII und A. CHROOCOCCUM. Welche der beiden Arten, oder beide gleichzeitig im Schlamm vorhanden sind, kann so nicht unterschieden werden.

Der Gegenpol zu diesen stickstofffixierenden Aerobiern sind die obligaten diazotrophen Anaerobier. Ihr Vorhandensein ist schon deshalb zu vermuten, weil der Schlamm des Harkortsees ein vorwiegend anaerobes Milieu darstellt. Clostridien sind chemo-organotroph. Sie finden in dem organisch hochbelasteten Schlamm gute Lebensmöglichkeiten. Sie vergären verschiedenste Zucker und Alkohole zu Säuren, wobei zunächst Essig- und Buttersäure gebildet werden. Der penetrante Geruch nach Buttersäure war jedesmal nach kurzer Zeit sehr stark wahrnehmbar, wenn Schlamm des Harkortsees mit Glucose oder Mannit zusammen kam. Ein zweites Indiz für das Vorhandensein von obligat anaeroben Stickstofffixierern ist die zahlenmäßige Verteilung. So wurde die Gesamtzahl stickstoff-

fixierender Anaerobier mit rund 1000 pro Gramm Schlamm ermittelt. Der Anteil der fakultativ anaeroben Enterobacteriaceen hieran betrug nur rund 10%, so daß die restlichen 900 obligate Anaerobier sein müssen. Die Clostridien zeichnen sich neben ihrer obligat anaeroben Lebensweise dadurch aus, daß sie gram-positive, peritrich begeißelte Sporenbildner sind. Sie kommen weit verbreitet im Boden, wie auch in den Sedimenten von Salz- und Süßwasser vor. Nach BURNS & HARDY, (1975) wurden von 93 Clostridien-Arten bisher 15 auf die Stickstofffixierung untersucht, wovon 13 diese Fähigkeit hatten. Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß wenigstens folgende diazotrophe Bakterien im Schlamm des Harkort-sees vorkommen:

Ord.: Eubacteriales

aerobe N_2 -Fixierer (wahrscheinl. AZOTOBACTER spec.)

Fam. Enterobacteriaceae

ESCHERICHIA-CITROBACTER-Intermediat (fak. anaer.)

KLEBSIELLA PNEUMONIAE (" ")

ENTEROBACTER CLOACAE (" ")

ERWINIA spec. (Herbicola-Gruppe) (" ")

Fam. Bacillaceae

obligate Anaerobier (wahrscheinl. CLOSTRIDIUM spec.)

Abschließend sei noch einmal festgestellt, daß durch die hier durchgeführten Untersuchungen eine Abnahme der Empfindlichkeit gegen äußere Einflüsse in der Reihenfolge:

Nitrogenase > Reinkultur stickstoff- > natürliches
Reinextrakt > fixierender Organismen > Schlammsediment

ermittelt wurde. Als Maß diente jeweils der Grad der Hemmung im Azetylenreduktionstest. Das hier untersuchte Schlammsediment war in manchen Fällen gegen gleiche Einflüsse unempfindlicher, als die aus der Literatur entnommenen Beeinflussungen bei Reinkulturen stickstofffixierender Bakterien oder Blaualgen bzw. Nitrogenase-Extrakten. Zellfreie Extrakte von AZOTOBACTER führen nur bis zu einem Ammoniumgehalt von 40 mg/l (= 2,22 mMol)

die Stickstofffixierung normal weiter, Konzentrationen ab 150 mg/l (= 8,33 mMol) spielen eine Rolle bei intakten Zellen von AZOTOBACTER (STEWART, 1969). In dem hier untersuchten Schlamm sediment wurde jedoch noch bei dem dreifachen Wert eine starke Förderung der Azetylenreduktion beobachtet. Auch die Empfindlichkeit gegen Sauerstoffeinflüsse ist bei dem Schlamm sediment viel geringer als bei Reinkulturen oder Nitrogenase-Extrakten, weil die stickstofffixierenden Organismen hier die Möglichkeit haben, ihre Nitrogenase durch Schlamm partikel bzw. Schleimbildung vor dem Sauerstoffangriff zu schützen, eine Möglichkeit, die sie in flüssigen Reinkulturen nicht haben. Das Maximum der aeroben Azetylenreduktion lag jedoch auch hier bei pO_2 , die niedriger waren als in der Atmosphäre. Mit 0,2 atm pO_2 war die Aktivitätsspitze bereits überschritten. Es wurden jedoch geringe Reduktionsraten auch bei sehr hohen Sauerstoffgehalten, selbst unter reinem Sauerstoff, festgestellt, die bei Reinkulturen oder Nitrogenase-Extrakten zu einer völligen Hemmung der Azetylenreduktion geführt hätten.

Eine Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse ergab sich hinsichtlich des Temperaturoptimums, das in allen bisher beschriebenen Fällen zwischen 25 °C und 28 °C liegt. Auch die Empfindlichkeit des Schlammes gegen Nitrate deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen, die SORGER, (1969) an Reinkulturen von AZOTOBACTER VINE-LANDII feststellte.

15. Anhang

=====

15.1. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung:	Seite
1: Die Stickstoffkreisläufe eines Gewässers.	10
2: Substrate und Reaktionsmechanismen der Nitrogenase.	18
3: Typisches Chromatogramm für die gaschromatographische Trennung von Methan, Äthylen und Azetylen.	23
4: Eichgerade für die quantitative gaschromatographische Bestimmung von Äthylen im Azetylenreduktionstest der biologischen Stickstofffixierung.	24
5: Der Harkortsee im Mittellauf der Ruhr.	49
6: Der Ammoniumgehalt des Schlammes und seine Azetylenreduktionsrate an verschiedenen Entnahmestellen im Harkortsee.	55
7: Die Azetylenreduktionsrate in Abhängigkeit vom Ammoniumgehalt des Schlammes an verschiedenen Entnahmestellen im Harkortsee.	56
8: Die Abhängigkeit der organischen Schlammbelastung von der Jahreszeit.	60
9: Biologisch-ökologischer Gütezustand des Harkortsees von Juli 1974 bis Oktober 1975.	68
10 bis 15: Netzplankton des Harkortsees.	70 - 72
16: Die Abhängigkeit der biologischen Azetylenreduktionsrate von der Inkubationstemperatur.	74
17: Die Abhängigkeit der biologischen Azetylenreduktion von der Inkubationstemperatur während der ersten 24 h Inkubationszeit.	75
18: Die Abhängigkeit der chemischen Azetylenreduktionsrate steriler Schlammproben von der Inkubationstemperatur.	78
19: Der Verlauf der anaeroben Azetylenreduktion während 96 h Inkubationszeit.	81
20: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom zugegebenen Ammoniumgehalt.	83
21: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Nitratgehalt.	86
22: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck.	89
23: Jahresgang der aeroben und anaeroben Azetylenreduktion.	91

Abbildung:	Seite
24: Die Abhängigkeit der aeroben Azetylenreduktionsrate von Antibiotika-Zugaben.	94
25: Schema zur Gewinnung von Reinkulturen stickstofffixierender Bakterien aus Schlammproben.	115

15.2. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle:

1: Die Bestimmung des Saprobienindex an den Entnahmestellen A-E im Harkortsee am 15.7.1974.	52
2: Die chemische Untersuchung des Wasserkörpers im Harkortsee an den Entnahmestellen A-E am 15.7.1974.	53
3: Vergleich der chemischen Untersuchungsbefunde mit den Azetylenreduktionsraten im Schlamm des Harkortsees an den Entnahmestellen A-F am 15.7.1974.	54
4: Berechnung der linearen Ausgleichsgeraden für die ersten vier Inkubationstage und der dazugehörigen "Bravais-Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r".	58
5: Physikalische und chemische Untersuchung des Schlammes im Harkortsee von Juni 1974 bis Mai 1975. Entnahmestelle: Bootssteg am Campingplatz.	59
6: Untersuchungen zum Verhältnis von organisch gebundenem Stickstoff zum Ammoniumgehalt im Schlamm des Harkortsees.	62
7: Die Einteilung des Saprobienindex und die daraus resultierenden Gewässergüteklassen, ohne Berücksichtigung der Zwischenstufen.	65
8: Die biologische Besiedlung des Harkortsees in Abhängigkeit von der Jahreszeit.	66
9: Die Abhängigkeit der biologischen Azetylenreduktionsrate von der Inkubationstemperatur. (Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse).	74
10: Die Abhängigkeit der chemischen Azetylenreduktionsrate steriler Schlammproben von der Inkubationstemperatur. (Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse).	78
11: Untersuchung der Azetylenreduktionsraten sterilisierter und ausgeglühter Schlammproben mit Chemikalienzusätzen.	79
12: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktion von der Inkubationszeit. (25 °C, anaerob, Mittelwerte aus zwei Parallelproben).	81
13: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate von höheren Ammoniumgehalten. (Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse).	83

Tabelle:	Seite
14: Mittelwerte der Azetylenreduktionsraten und Anzahl nMol C_2H_4 /kg bei Dosierungen zwischen 500 - 1000 mMol Ammonium pro kg Schlamm.	84
15: Mittelwerte der Untersuchungsergebnisse zur Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Nitratgehalt bei Zugaben von 20 - 200 mMol NO_3^- /kg Schlamm.	85
16: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Nitratgehalt. (Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse).	86
17: Die Abhängigkeit der Azetylenreduktionsrate vom Sauerstoffpartialdruck. (Mittelwerte aller Untersuchungsergebnisse).	89
18: Die aerobe Azetylenreduktionsrate unter Einfluß von Antibiotika.	94
19: Die prozentuale Abnahme der aeroben Azetylenreduktion unter Einfluß verschiedener Antibiotika und Antibiotika-Konzentrationen.	95
20: Berechnungen zur jährlichen Stickstofffixierung im Harkortsee.	99
21: Die Bestimmung der Koloniezahl, Coli-Keimzahl und Anaerobier im Schlamm des Harkortsees.	101
22: Die Beeinflussung der Azetylenreduktionsrate anaerober Stickstofffixierer durch verschiedene Elutionsmittel.	102
23: Untersuchungen zu den Nährstoffansprüchen aerober und anaerober Stickstofffixierer.	106
24: Untersuchung verschiedener Varianten des RHIZOBIUM-Mediums 20 E (WERNER et al., 1975) auf ihre Verwendbarkeit bei der Reinkultur freilebender fakultativ anaerober Stickstofffixierer.	112

16. Literaturverzeichnis

=====

Abwassertechnische Vereinigung (1976):

Grundsätze für die Bemessung des biologischen Teiles von Kläranlagen mit Anschlußwerten zwischen 500 und 10 000 Einwohnerggleichwerten nach dem Belüftungsverfahren mit gemeinsamer Schlammstabilisierung. - Arbeitsblatt A 126, 13 S., Bonn.

Becker, H. (1974):

Routinetestmethoden zur Identifizierung von Bakterien. - Mikrokosmos 7: 207 - 211.

Beger, H. (1966):

Leitfaden der Trink- und Brauchwasserbiologie. - 2. Aufl., 360 S., Stuttgart.

Bergersen, F.J. (1970):

The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene reduction assay. - Aust. J. biol. Sci. 23: 1015 - 1025.

Billson, S., Williams, K. & Postgate, J.R. (1970):

A note on the effect of diluents on the determination of viable numbers of Azotobacteriaceae. - J. appl. Bact. 33: 270 - 273.

Blair, J.E., Lennette, E.H. & Truant, J.P. (1970):

Manual of clinical microbiology. - 727 S., Bethesda, Md.

Bone, D.H. (1971):

Nitrogenase activity and nitrogen assimilation in ANABAENA FLOS-AQUAE growing in continuous culture. - Arch. Microbiol. 80: 234 - 241.

Brezonik, P.L. & Harper, C.L. (1969):

Nitrogen fixation in some anoxic lacustrine environments. - Science 164: 1277 - 1279.

Brooks, R.H., Brezonik, P.L., Putnam, H.D. & Keirn, M.A. (1971):

Nitrogen fixation in an estuarine environment: The Waccasassa on the Florida gulf coast. - Limnol. Oceanogr. 16: 701 - 710.

Brouzes, R. & Knowles, R. (1971):

Inhibition of growth of CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM by acetylene: Implications for nitrogen fixation assay. - Canad. J. Microbiol. 17: 1483 - 1489.

Brouzes, R., Mayfield, C.I. & Knowles, R. (1971):

Effects of oxygen partial pressure on nitrogen fixation and acetylene reduction in a sandy loam soil amended with glucose, p. 481 - 494.

- In T. Lie, E. Mulder (ed.), Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. - Pl. Soil Spec. Vol.
- Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E.(ed.) (1974):
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. - 8. Ausg., 1246S., Baltimore.
- Burns, R.C. & Hardy, R.W.F. (1975):
Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Bd. 21 der Reihe: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics. - 189 S., Berlin/Heidelberg/New York.
- Burris, R.H. (1966):
Biological nitrogen fixation. - Ann. Rev. Plant Physiol. 17: 155 - 184.
- Burris, R.H. (1969):
Progress in the biochemistry of nitrogen fixation.- Proc. Roy. Soc. B 172: 339 - 354.
- Carnahan, J.E., Mortenson, L.E., Mower, H.F. & Castle, J.E. (1960):
Nitrogen fixation in cell-free extracts of CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM. - Biochim. Biophys. Acta 44: 520 - 535.
- Czygan, F.-Ch. (1971):
Der Stickstoffkreislauf in der Natur. - Biol. uns. Zeit 1. 101 - 110.
- Dart, P.J. & Day, J.M. (1971):
Effects of incubation temperature and oxygen tension on nitrogenase activity of legume root nodules, p. 167 - 184. In T. Lie, E. Mulder (ed.), Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. - Pl. Soil Spec. Vol.
- Dilworth, M.J. (1966):
Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM. - Biochim. Biophys. Acta 127: 285 - 294.
- Dittrich, H.H. (1973):
Bakterien, Hefen, Schimmelpilze. Einführung in die Kleinlebewelt. - 4. Aufl., 87 S., Stuttgart.
- Drews, G. (1974):
Mikrobiologisches Praktikum. - 2. Aufl., 230 S., Berlin.
- Drozd, J. & Postgate, J.R. (1970):
Interference by oxygen in the acetylene-reduction test for aerobic nitrogen-fixing bacteria. - J. gen. Microbiol. 60: 427 - 429.

- Duong, T.P. & Tiedje, J.M. (1971):
Factors affecting growth and acetylene reduction of photosynthetic bacteria isolated from lake sediments. - Agron. Abs. p. 81.
- Eppendorf, (Fa.) (1960):
Wasser- und Metallanalysen mit dem Photometer "Eppendorf". - Hamburg.
- Fachgruppe Wasserchemie (1975):
Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Physikalische, chemische und bakteriologische Verfahren. - 3. Aufl., 7. Lief., Weinheim.
- Fischler, I. & Koerner von Gustorf, E. (1975):
Chemische und biologische Aspekte der Fixierung und Reduktion molekularen Stickstoffs. - Naturwissenschaften 62: 63 - 70.
- Fogg, G.E. (1971):
Nitrogen fixation in lakes, p. 393 - 401. In T. Lie, E. Mulder (ed.), Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. - Pl. Soil Spec. Vol.
- Fogg, G.E. (1974):
Nitrogen fixation, p. 560 - 582. In W.D.P. Stewart (ed.), Algae physiology and biochemistry. - Oxford.
- Fott, B. (1971):
Algenkunde. - 2. Aufl., 581 S., Stuttgart.
- Friedrich, G. (1973):
Ökologische Untersuchungen an einem thermisch anomalen Fließgewässer (Erft/Niederrhein). - Schriftenreihe der Landesanstalt für Wasser- und Abfall NRW Bd. 33, 125 S., Krefeld.
- Goering, J.J. & Neess, J.C. (1964):
Nitrogen fixation in two Wisconsin lakes. - Limnol. Oceanogr. 9: 530 - 539.
- Granhall, U. & Lundgren, A. (1971):
Nitrogen fixation in lake Erken. - Limnol. Oceanogr. 16: 711 - 719.
- Hardy, R.W.F. & Burns, R.C. (1968):
Biological nitrogen fixation. - Ann. Rev. Biochem. 37: 331 - 358.

Hardy, R.W.F., Burns, R.C., Hebert, R.R., Holsten, R.D. & Jackson, E.K. (1971 a):

Biological nitrogen fixation: A key to world protein, p. 561 - 590. In T. Lie, E. Mulder (ed.), Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. - Pl. Soil Sec. Vol.

Hardy, R.W.F., Burns, R.C. & Holsten, R.D. (1973):

Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. - Soil Biol. Biochem. 5: 47 - 81.

Hardy, R.W.F., Burns, R.C. & Parshall, G.W. (1971 b):

The biochemistry of N_2 fixation. - Advan. Chem. Ser. 100: 219 - 247.

Hardy, R.W.F. & Holsten, R.D. (1972):

Global nitrogen cycling. Pools, evolution, transformations, transfers, quantitation and research needs. - Presented at the Environmental Protection Agency Symposium on "The Aquatic Environment: Microbial Transformations and Water Quality Management Implications." Washington D.C. Oct. 3-4.

Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K. & Burns, R.C. (1968):

The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: Laboratory and field evaluation. = Plant Physiol. 43: 1185 - 1207.

Hardy, R.W.F. & Knight, E. (1967):

ATP-dependent reduction of azide and HCN by N_2 -fixing enzymes of *AZOTOBACTER VINELANDII* and *CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM*. - Biochim. Biophys. Acta 139: 69 - 90.

Heil, K. (1973):

Genetik der Stickstofffixierung. - Naturw. Rdsch. 11: 481 - 482.

Hino, S. & Wilson, P.W. (1958):

Failure of putative nitrogen-fixing bacteria to fix nitrogen. - J. gen. Microbiol. 58: 277 - 285.

Höll, K. (1970):

Wasser. Untersuchung, Beurteilung, Aufbereitung, Chemie, Bakteriologie, Biologie. - 5. Aufl., 423 S., Berlin.

Horne, A.J. & Fogg, G.E. (1970):

Nitrogen fixation in some English lakes. - Proc. Roy. Soc. B 175: 351 - 366.

Howard, D.L., Frea, J.I., Pfister, R.M. & Dugan, P.R. (1970):

Biological nitrogen fixation in lake Erie. - Science 169: 61 - 62.

Hübel, H. & Hübel, M. (1974 a):

In-situ-Messungen der diurnalen Stickstofffixierung an Mikrobenthos der Ostseeküste. - Arch. Hydrobiol. Suppl. 46: 39 - 54.

Hübel, H. & Hübel, M. (1974 b):

Stickstofffixierung in Küstengewässern der mittleren Ostsee. - Z. f. allg. Mikrobiol. 14: 618-619.

Jensen, V. (1961):

Rhamnose for detection and isolation of AZOTOBACTER VINELANDII (Lipman). - Nature 190: 832 - 833.

Kaiser, R.E. (1969):

Chromatographie in der Gasphase. IV. Quantitative Auswertung 1. Teil. - B.I. HTB Bd. 92/92 a, S. 1 - 185, Mannheim.

Kaiser, R.E. (1969):

Chromatographie in der Gasphase. IV. Quantitative Auswertung 2. Teil. - B.I. HTB Bd. 472/472 a, S. 186 - 293, Mannheim.

Kaiser, R.E. & Gottschalk, G. (1972):

Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten. - B.I. HTB Bd. 774, 68 S., Mannheim.

Kaiser, R.E. (1974):

Einführung in die quantitative Gaschromatographie.- Manuskript zum gleichnamigen Kursus, Loseblattsammlung, Bad Dürkheim.

Kavanagh, E.P. & Postgate, J.R. (1970):

Absorption and release of hydrocarbons by rubber closures: A source of error in some biological essays. - Lab. Pract. 19: 159 - 160.

Kawai, A. & Sugahara, I. (1971):

Microbiological studies on nitrogen fixation in aquatic environments. I. On the distribution of nitrogen-fixing bacteria in fresh water regions. - Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries 37: 740 - 746.

Keirn, M.A. & Brezonik, P.L. (1971):

Nitrogen fixation by bacteria in lake Mize, Florida, and in some lacustrine sediments. - Limnol. Oceanogr. 16: 720 - 731.

Kellerer, H. (1960):

Statistik im modernen Wirtschafts- und Sozialleben. - roro Reinbek/Hamburg.

Kelly, M. (1968):

The kinetics of the reduction of isocyanides, acetylenes and the cyanide ion by nitrogenase preparations from *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* and the effects of inhibitors. - *Biochem. J.* 107: 1 - 6.

Kleiner, D. (1975):

Die Bindung des atmosphärischen Stickstoffs durch Mikroorganismen. - *Angew. Chem.* 87: 97 - 103.

Koch, B. & Evans, H.J. (1966):

Reduction of acetylene by soybean root nodules. - *Plant Physiol.* 41: 1748 - 1750.

Kolkwitz, R. & Marsson, M. (1902):

Grundsätze für die biologische Beurteilung des Wassers nach seiner Flora und Fauna. - *Mitt. K. Prüfanst. f. Wasservers. u. Abwasserbes.* 1: 33 ff.

Liebmann, H. (1951):

Handbuch der Frischwasser- und Abwasserbiologie.- Bd. I, 540 S., München.

Liebmann, H. (1960):

Handbuch der Frischwasser- und Abwasserbiologie.- Bd. II, 1149 S., München.

Mauch, E. (1976):

Leitformen der Saprobität für die biologische Gewässeranalyse. - 5 Bände, Senckenbergische Naturforschende Gesellschaft, Frankfurt.

Milekhina, E.I., Rakhleeva, E.E. & Ivanov, I.D. (1971):

Influence of both the partial pressure of oxygen and the substrate concentration on acetylene reduction by intact cells of *AZOTOBACTER VINELANDII*. - *Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Biol.* 2: 255 - 260.

Nicholas, D.J.D. (1963):

The biochemistry of nitrogen fixation. - *Symp. Soc. gen. Microbiol.* 13: 92 - 124.

Nygaard, G. (1949):

Hydrobiological studies on some Danish ponds and lakes. - *Kong. Danske Vid. Selsk.* 7: 1 - 263.

Pantle, R. & Buck, H. (1955):

Die biologische Überwachung der Gewässer und die Darstellung der Ergebnisse. - *Gas- u. Wasserfach* 18: 604.

Pate, J.L., Shah, V.K. & Brill, W.J. (1973):

Internal membrane control in *AZOTOBACTER VINE-*
LANDII. - J. Bacteriol. 114: 1346 - 1350.

Pochon, J. (1954):

Manuel technique d'analyse microbiologique du
sol. - Monogr. de l'Inst. Pasteur, 123 S., Paris.

Pochon, J. (1956):

Technique de préparation des suspensions-dilutions
de terre pour analyse microbiologique. - Ann.
Inst. Pasteur 89: 464 - 465.

Pöppinghaus, K. (1975):

Chemisch physikalische und biologische Maßnahmen
zur Stickstoffeliminierung aus Abwasser,
p. 77 - 117. In Bd. 17 "Gewässerschutz/Wasser/
Abwasser": Die weitergehende Abwasserreinigung
unter besonderer Berücksichtigung der Phosphor-
und Stickstoffeliminierung im technischen Maß-
stab. - Aussprachetagung am 20. und 21.6.1974
in Roetgen. Ges. zur Förderung d. Inst. f. Sied-
lungswasserwirtschaft der RWTH Aachen.

Postgate, J.R. (1970):

Biological nitrogen fixation. - Nature 226: 25-27.

Postgate, J.R. (1971):

Biochemical and physiological studies with free-
living nitrogen-fixing bacteria, p. 551 - 559.
In T. Lie, E. Mulder (ed.), Biological nitrogen
fixation in natural and agricultural habitats. -
Pl. Soil Spec. Vol.

Postgate, J.R. (1972):

The acetylene reduction test for nitrogen fixation,
p. 343 - 356. In J. Norris, D. Ribbons, Methods
in Microbiology. - Vol. 6 B., London.

Quispel, A. (ed.) (1974):

The biology of nitrogen fixation, 769 S. In
A. Neuberger, E.L. Tatum, Frontiers of Biology. -
Bd. 33, Amsterdam/Oxford.

Raju, P.N., Evans, H.J. & Seidler, R.J. (1972):

A symbiotic nitrogen-fixing bacterium from the
root environment of corn. - Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S. 69: 3474 - 3478.

Rice, W.A. & Paul, E.A. (1971):

The acetylene reduction assay for measuring nitro-
gen fixation in waterlogged soil. - Canad. J.
Microbiol. 17: 1049 - 1056.

Rüdiger, H. (1972):

Die biologische Fixierung von Stickstoff. -
Chem. uns. Zeit 2: 59 - 64.

Rusness, D. & Burris, R.H. (1970):

Acetylene reduction (nitrogen fixation) in Wisconsin lakes. - Limnol. Oceanogr. 15: 808 - 813.

Schlegel, H.G. (Hrsg.) (1965):

Anreicherungskultur und Mutantenauslese. Symposium in Göttingen vom 28. - 30.4.1964. - Zentralbl. f. Bakteriол. Parasitenk. Infektionskrankh. u. Hygiene, I. Abteilg., Suppl. 1: 510 S., Stuttgart.

Schlegel, H.G. (1976):

Allgemeine Mikrobiologie. - 4. Aufl., 480 S., Thieme Stuttgart.

Schöllhorn, R. & Burris, R.H. (1967):

Acetylene as a competitive inhibitor of N_2 -fixation. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58: 213-216.

Schrauzer, G.N. & Doemeny, P.A. (1971):

Chemical evolution of a nitrogenase model. II. Molybdate-Cysteine and related catalysts in the reduction of acetylene to olefins and alkanes. - J. Am. Chem. Soc. 93: 1608 - 1618.

Schwoerbel, J. (1966):

Methoden der Hydrobiologie. - 207 S., Stuttgart.

Silver, W.S. (1967):

Biological nitrogen fixation. - Science 157: 100 - 102.

Silver, W.S. & Postgate, J.R. (1973):

Evolution of symbiotic nitrogen fixation. - J. theor. Biol. 40: 1 - 10.

Sladeczek, V. (1973):

System of water quality from the biological point of view, In Ergebnisse der Limnologie, Heft 7, Schweizerbarth, Stuttgart.

Sorger, G.J. (1969):

Regulation of nitrogen fixation in AZOTOBACTER VINELANDII: The role of nitrate reductase. - J. Bacteriol. 98: 56 - 61.

Statistisches Bundesamt (1976):

Statistisches Jahrbuch 1976 für die Bundesrepublik Deutschland. - 744 S., Stuttgart und Mainz.

Stewart, W.D.P. (1969):

Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living micro-organisms. - Proc. Roy. Soc. B. 172: 367 - 388.

Stewart, W.D.P., Fitzgerald, G.P. & Burris, R.H. (1967):

In situ studies on N_2 -fixation using the acetylene reduction technique. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58: 2071 - 2078.

Stewart, W.D.P., Mague, T., Fitzgerald, G.P. & Burris, R.H. (1971):

Nitrogenase activity in Wisconsin lakes of differing degrees of eutrophication. - New Phytol. 70: 497 - 509.

Streble, H. & Krauter, D. (1973):

Das Leben im Wassertropfen. Mikroflora und Mikrofauna des Süßwassers. - 351 S., Stuttgart.

Sugahara, I., Sawada, T. & Kawai, A. (1971):

Microbiological studies on nitrogen fixation in aquatic environments. VI. On the in situ nitrogen fixation in water regions. - Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries 37: 1093 - 1099.

Thake, B. & Rawle, P.R. (1972):

Non-biological production of ethylene in the acetylene-reduction-assay for nitrogenase. - Arch. Microbiol. 85: 39 - 43.

Tobias, W. (1974):

Kriterien für die ökologische Beurteilung des unteren Mains. - Courier Forschungsinst. Senckenberg 11: 136 S., Frankfurt.

Wenzl, H. (1934):

Zur Methodik der Keimzahlbestimmung von AZOTOBACTER im Boden. - Zentralbl. f. Bakt. II. Abt., Bd. 90: 289 - 314.

Werner, D. (1974):

Symbiontische und semi-symbiontische Stickstofffixierung. - Naturw. Rdsch. 5: 177 - 182.

Werner, D., Evans, H.J. & Seidler, R.J. (1974):

Facultatively anaerobic nitrogen-fixing bacteria from the marine environment. - Canad. J. Microbiol. 20: 59 - 64.

- Werner, D., Wilcockson, J. & Zimmermann, E. (1975):
Adsorption and selection of Rhizobia with ion-exchange papers. - Arch. Microbiol. 105: 27 - 32.
- Wilcockson, J. & Werner, D. (1976):
Nitrogenase activity by KLEBSIELLA and RHIZOBIUM on solid substrata exposed to air. - Ber. Deutsch. Bot. Ges. 89: 587 - 607.
- Wilson, P.W., Hull, J.F. & Burris, R.H. (1943):
Competition between free and combined nitrogen in nutrition of AZOTOBACTER. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 29: 289 - 294.
- Zimmermann, M. & Pohl, H. (1974):
Photometrische Metall- und Wasseranalysen. - 3. Aufl., 3. Lief., Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Zumft, W.G. & Mortenson, L.E. (1975):
The nitrogen-fixing complex of bacteria. - Biochim. Biophys. Acta 416: 1 - 52.

17. Lebenslauf

Am 8. November 1945 wurde ich, Dieter Jaeger, als Sohn des Kaufmannes Wilhelm Jaeger und seiner Ehefrau Lotte, geb. Quast, in Odenspiel (Krs. Oberberg) geboren. Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschule Odenspiel, anschließend bis 1965 das humanistisch-neusprachliche Hollenberg-Gymnasium in Waldbröl. Am 23.2.1965 legte ich hier das Abitur ab. Vom 1.4.1965 bis 31.3.1967 leistete ich einen zweijährigen Militärdienst ab. Beginnend mit dem Sommersemester 1967 nahm ich das Studium der Fächer Biologie und Chemie an der Philipps-Universität Marburg auf. Meine akademischen Lehrer waren:

In Biologie: Prof. Dr. KOECKE, Prof. Dr. MATTES, Prof. Dr. KESSEL, Prof. Dr. LÜDTKE, Prof. Dr. NULTSCH, Prof. Dr. von STOSCH, Prof. Dr. WEHRMEYER, Prof. Dr. WERNER, Prof. Dr. HENSSEN, Dr. SENGEL. In Chemie: Prof. Dr. DIMROTH, Prof. Dr. NÜTH, Prof. Dr. PFELL, Prof. Dr. WITZEL. In Physik: Prof. Dr. WALCHER, Prof. Dr. STUKE, Prof. Dr. VOITLÄNDER.

In Erziehungswissenschaften: Prof. Dr. KLAFKI, Prof. Dr. SEIDELMANN, Prof. Dr. LUTHER.

Während des Studienganges legte ich am 29.4.1969 die Zwischenprüfung in den Fächern Biologie und Chemie, sowie am 21.1.1971 das vorgezogene Staatsexamen in Erziehungswissenschaften ab. Das Studium beendete ich am 25.1.1972 mit dem Staatsexamen.

Von 1970 bis 1972 war ich als studentische Hilfskraft am botanischen Institut (SS 1970) und als Tutor am zoologischen Institut (WS 1970/71, SS 1971, WS 1971/72) beschäftigt. Am 15.6.1972 erfolgte die Anstellung als Leiter des biologischen Labors am Wasserwirtschaftsamt Hagen. Am 3.5.1973 legte ich zusätzlich zum Staatsexamen die Diplom-Prüfung in Biologie ab.

Am 14.10.1976 wurde ich unter Berufung in das Beamtenverhältnis zum Regierungsrat z.A. ernannt.

